

**UNIVERSIDAD DE PANAMA  
VICERRECTORIA DE INVESTIGACIÓN Y POSTGRADO  
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS  
PROGRAMA DE MAESTRIA EN CIENCIAS PECUARIAS CON  
ENFASIS EN PRODUCCION ANIMAL**

**EFFECTO DE LA SINCRONIZACION DE LA ONDA FOLICULAR Y  
LA FRECUENCIA DE RECOLECCIÓN SOBRE LA OBTENCIÓN  
DE OVOCITOS MEDIANTE ASPIRACION FOLICULAR  
TRANSVAGINAL GUIADA POR ECOGRAFÍA EN NOVILLAS  
BRAHMAN**

**ALEX JOSSUE SOLIS CORRALES  
6 707-2116**

**DAVID CHIRIQUÍ**

**REPUBLICA DE PANAMA**

**2011**

**EFFECTO DE LA SINCRONIZACIÓN DE LA ONDA FOLICULAR Y  
LA FRECUENCIA DE RECOLECCIÓN SOBRE LA OBTENCIÓN  
DE OVOCITOS MEDIANTE ASPIRACIÓN FOLICULAR  
TRANSVAGINAL GUIADA POR ECOGRAFÍA EN NOVILLAS  
BRAHMAN**

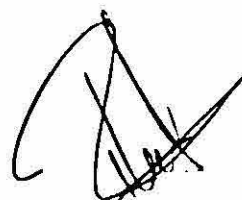
**TRABAJO DE GRADUACIÓN SOMETIDO PARA OPTAR POR EL  
TÍTULO DE MAESTRO EN CIENCIAS PECUARIAS CON  
ÉNFASIS EN PRODUCCIÓN ANIMAL**

**VICERRECTORÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSTGRADO  
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS  
PROGRAMA DE MAESTRÍA EN CIENCIAS PECUARIAS CON  
ÉNFASIS EN PRODUCCIÓN ANIMAL**

**PERMISO PARA SU PUBLICACIÓN, REPRODUCCIÓN TOTAL O  
PARCIAL DEBE SER OBTENIDA DE LA FACULTAD DE  
CIENCIAS AGROPECUARIAS**

**APROBADO:**

**PROF. DR. REINALDO DE ARMAS**



**DIRECTOR**

**PROF. ING. PEDRO GUERRA**



**ASESOR**

**PROF. ING. NEFTALÍ APARICIO**



**ASESOR**

**DAVID, CHIRIQUÍ  
REPÚBLICA DE PANAMÁ**

**2011**

## **AGRADECIMIENTO**

Agradezco a Dios Padre todo poderoso por permitirme realizar este trabajo al escuchar las oraciones de mi madre Mitzi Corrales a quien le estaré eternamente agradecido por su apoyo incondicional en todas las etapas de mi vida A mi esposa Larithza Hernandez por darme la mayor inspiración de mi vida mi hija Anne Loraine y porque a pesar de los problemas siempre ha estado allí para tenderme la mano cuando lo he necesitado gracias Lary A mis hermanos Alex Javier Solis y Karoll Solis ahora acompañados de mis cuñados Yandrick y Edison sin dejar a mi querido sobrino Jeicob gracias a todos por su amor fraterno y gracias Jeicob por esconderme los libros y jugar conmigo en los momentos de estrés A todos mis profesores por lograr forjar en mi persona las bases de un profesional con aptitud y actitud Ing Gerardo Sandoya Ing Pedro Guerra Ing Neftali Aparicio Ing Alex Samudio Ing Edil Arauz y muy especialmente al Dr Reinaldo de Armas quien además de un excelente maestro ha sido como un padre para mí Al Dr Juan Miguel Osorio por sus pertinentes intervenciones como garante del buen funcionamiento del programa de maestría en Ciencias Pecuarias A la Licda Magdalena Justavino por su respaldo durante todo el camino A la SENACYT por confiar en la capacidad y el potencial nacional a través de la Licda Jane Saldaña a la cual le estoy muy agradecido por su respaldo y apoyo en todo momento A los ingenieros Gabriel Rodríguez Adolfo Zambrano y mi socio y amigo Reggie Guerra quienes

## RESUMEN

El presente estudio fue desarrollado con el objetivo evaluar dos metodos de sincronización de la emergencia de la onda folicular y dos frecuencias de recolección para la obtención de ovocitos mediante aspiración folicular transvaginal guiada por ecografia y su posterior influencia sobre el ciclo sexual de las hembras tratadas Este trabajo fue realizado en la Unidad de Biotecnologia del Centro de Investigacion en Biotecnologia Agropecuaria de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad de Panamá En el mismo se utilizaron 16 novillas de la raza Brahman las cuales contaban con un peso aproximado de 820 a 1125 libras edades entre 34 y 46 meses condición corporal de 3.5 a 4.0 (escala de 1 a 5) y todas se encontraban ciclando Todos los animales fueron sometidos a sesiones de aspiración durante siete semanas En un diseño de bloques completamente al azar con arreglo factorial 2x2 fueron conformados cuatro grupos (cuatro animales por tratamiento) en función de la sincronización de la onda folicular (por punción o por el método hormona usando benzoato de estradiol más progesterona) y la frecuencia de aspiración empleadas (de una o dos veces a la semana) quedando los tratamientos distribuidos de la siguiente manera *tratamiento uno* se sincronizó la onda mediante punción folicular y se realizó una aspiración semanal (T1 P1x) *tratamiento dos* se sincronizó la onda mediante punción folicular y se realizaron dos aspiraciones semanales (T2 P2x) *tratamiento tres* Se sincronizo la onda

mediante el método hormonal y se realizó una aspiración semanal (T3 H1x) *tratamiento cuatro* se sincronizó la onda mediante el método hormonal y se realizaron dos aspiraciones semanales (T4 H2x) Se obtuvieron promedios semanales de numero de folículos aspirados en el orden de  $18.5 \pm 1.3$   $35.5 \pm 1.3$   $18.4 \pm 1.3$   $36.2 \pm 1.3$  y COCs recuperados de  $12.0 \pm 0.8$   $17.6 \pm 0.8$   $11.3 \pm 0.8$  y  $19.5 \pm 0.8$  para los tratamientos T1 P1x T2 P2x T3 H1x y T4 H2x respectivamente El numero de folículos aspirados y el total de COCs recuperados por sesion para los tratamiento T1 P1x T2 P2x T3 H1x y T4 H2x fue de  $18.5 \pm 1.2$   $17.8 \pm 1.2$   $18.4 \pm 1.2$   $18.1 \pm 1.2$  y  $12.0 \pm 0.6$   $8.8 \pm 0.6$   $11.3 \pm 0.6$   $9.7 \pm 0.6$  respectivamente Se concluyó que no existen dferencias significativas para numero de folículos aspirados numero de COCs obtenidos y calidad de COCs recuperados independientemente del método de sincronización de la onda folicular La frecuencia de aspiración dos veces a la semana permite la disponibilidad de mayor numero de folículos para la aspiración y más complejos COCs por semana pero igual cantidad de folículos y mayor cantidad de COCs son obtenidos por sesión de aspiración cuando se emplea la frecuencia de aspiración una vez a la semana Las frecuencias de aspiración de una o dos veces a la semana no afectan la calidad de los ovocitos recuperados El numero promedio de folículos aspirados de ovocitos recuperados y de ovocitos por calidad fue analizado empleando el procedimiento GLM de SAS (The SAS System)

**Palabras Clave** Aspiración folicular sincronización de la onda folicular frecuencia de recolección obtención de ovocitos

## **ABSTRACT**

This research was developed to evaluate two methods of synchronization of follicular wave emergence and two frequencies of collection to obtain oocytes by transvaginal follicular aspiration guided by ultrasound and its subsequent influence on the female sexual cycle treated. This work was performed at the Biotechnology Center of Research in Agricultural Biotechnology of the Faculty of Agricultural Sciences of the University of Panama. In the same using 16 Brahman heifers race which had an approximate weight of 820 to 1125 pounds ages 34 and 46 months body condition of 3.5 to 4.0 (scale of 1 to 5) and all of them were cycling. All animals underwent aspiration sessions for seven weeks. In a block design randomized 2x2 factorial arrangement were formed four groups (four animals per treatment) depending on the synchronization of follicular wave (by puncture or by the method using hormone estradiol benzoate plus progesterone) and suction frequently used (one or two times a week) leaving the treatments were distributed such as: treatment one the wave was synchronized by follicular puncture and the aspirations were once weekly (T1 P1x), treatment two wave synchronized by follicular puncture and the aspirations were twice weekly (T2 P2X), treatment three the wave was synchronized by hormonal method and the aspirations were conducted once weekly (T3 H1x), treatment four the wave was synchronized by hormonal method and there were two weekly aspirations (T4 H2x). Weekly average were aspirated follicle numbers in the order of  $18.5 \pm 1.3$ ,  $35.5 \pm 1.3$ ,  $18.4 \pm 1.3$ ,  $36.2 \pm 1.3$  and COCs

recovered from  $12.0 \pm 0.8$   $17.6 \pm 0.8$   $11.3 \pm 0.8$  and  $19.5 \pm 0.8$  for treatments T1 P1x T2 P2x T3 H1x and T4 H2x respectively. The number of follicles aspirated and the total number of COCs recovered per session for T1 P1x T2 P2x T3 H1x and T4 H2x was  $18.5 \pm 1.2$   $17.8 \pm 1.2$   $18.4 \pm 1.2$   $18.1 \pm 1.2$  and  $12.0 \pm 0.6$   $8.8 \pm 0.6$   $11.3 \pm 0.6$   $9.7 \pm 0.6$  respectively. It was concluded that no significant differences for number of follicles aspirated, number of COCs obtained and quality of COCs recovered, regardless of method of synchronizing follicular wave. The frequency of aspiration twice a weekly allows the twice a week allows the availability of more numbers of follicles for the aspiration and more complex COCs per week, but still much greater number of follicles and COCs are obtained by aspiration session when using the frequency of aspiration once a week. The frequency of aspiration of one or twice a week does not affect the quality of oocytes retrieved. The average number of follicles aspirated, oocytes recovered and oocyte per quality was analyzed by using the GLM procedure of SAS (The SAS System).

**Key Words** Follicular aspiration, follicular wave synchronization, frequency of collection, collection of oocytes.

## INDICE DE CONTENIDO

	<b>Paginas</b>
<b>PAGINA DEL TITULO</b>	<b>I</b>
<b>PAGINA DE APROBACIÓN</b>	<b>II</b>
<b>AGRADECIMIENTO</b>	<b>III</b>
<b>DEDICATORIA</b>	<b>V</b>
<b>RESUMEN</b>	<b>VI</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>VIII</b>
<b>ÍNDICE DE CONTENIDO</b>	<b>X</b>
<b>INDICE DE CUADROS</b>	<b>XIII</b>
<b>INDICE DE FIGURAS</b>	<b>XIV</b>
<b>1 INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
<b>2 REVISIÓN DE LITERATURA</b>	<b>7</b>
<b>A HISTOLOGÍA FUNCIONAL DEL OVARIO</b>	<b>7</b>
1 Descripción General	7
2 Folículos	8
2 1 Foliculogenesis	9
2 1 1 Folículos Primordiales y Primarios	9
2 1 2 Folículos Secundarios	11
2 1 3 Folículos Terciarios	12



2 1 4 Folículo de Graaf	14
2 2 Ovogenesis	17
3 Cuerpo Luteo	23
B DINAMICA FOLICULAR DURANTE EL CICLO ESTRAL DEL BOVINO	28
1 Factores que Regulan la Dinámica Folicular	31
C ULTRASONOGRAFÍA Y SU EMPLEO EN REPRODUCCIÓN BOVINA	36
1 Principios	37
2 Aplicación	41
2 1 Determinacion del Estado Funcional Ovarico	42
2 2 Diagnóstico Precoz de la Gestacion y Determinación del Tiempo de Gestación	44
2 3 Determinacion del Sexo Fetal	45
2 4 Estudio de la Dinamica Folicular	46
2 5 Aspiración Folicular Transvaginal para Obtención de Ovocitos	47
2 6 Diagnóstico de Patologías del Aparato Reproductor	48
D ASPIRACIÓN FOLICULAR TRANSVAGINAL GUIADA POR ECOGRAFÍA EN EL BOVINO (OVUM PICK UP OPU)	50
1 Aplicaciones de la Técnica	51
2 Descripción de la Técnica	54
2 1 Clasificación de Ovocitos	57

3 Factores que Inciden en los Resultados de la Técnica	58
3 1 Factores Técnicos que Influyen en los Resultados	59
3 1 1 Tipo y Calidad de las Aguja Utilizada	59
3 1 2 Presión de Aspiración	60
3 2 Factores Biológicos que Influyen en los Resultados	62
3 2 1 Frecuencia de la Punción Folicular y el Momento Relativo al Ciclo de la Donante	62
3 2 2 Condición Fisiológica y Corporal de las Donantes	63
3 2 3 Raza Edad Fertilidad y Categoría de la Donante	64
3 2 4 Estimulación Hormonal Previa a OPU	66
4 Salud de las Donantes de Ovocitos	69
5 Producción de Embriones por Fecundación <i>in vitro</i> a Partir de Donantes Vivas versus Programas Convencionales de Transferencia de Embriones por Superovulación (MOET)	70
<b>3 MATERIALES Y MÉTODOS</b>	73
<b>4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	83
<b>5 CONCLUSIONES</b>	94
<b>6 RECOMENDACIONES</b>	95
<b>7 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	96

## INDICE DE CUADROS

	Paginas
CUADRO I CRITERIOS DE SELECCIÓN DE LOS COMPLEJOS CUMULUS OVOCITOS	58
CUADRO II ANÁLISIS DE VARIANZA DEL MODELO ESTADÍSTICO	82
CUADRO III ANÁLISIS DE VARIANZA DEL PROMEDIO TOTAL DE OVOCITOS RECUPERADOS EN CADA TRATAMIENTO GL GRADOS DE LIBERTAD CV COEFICIENTE DE VARIACIÓN BLK BLOQUES TRT TRATAMIENTO REP REPLICAS	84
CUADRO IV NUMERO DE FOLÍCULOS ASPIRADOS OVOCITOS RECUPERADOS Y PORCENTAJE DE RECUPERACIÓN DE OVOCITOS POR SEMANA	85
CUADRO V PROMEDIO TOTAL DE OVOCITOS RECUPERADOS Y NUMERO DE FOLÍCULOS ASPIRADOS POR SESIÓN DE ASPIRACIÓN	89
CUADRO VI GRADOS DE CALIDAD DE LOS OVOCITOS ASPIRADOS POR TRATAMIENTO	90
CUADRO VII PORCENTAJE DE GRADOS DE CALIDAD DE COCS OBTENIDOS POR TRATAMIENTO	91

## INDICE DE FIGURAS

	<b>Paginas</b>
FIGURA No 1 OVARIO MAMÍFERO FORMACIONES OVÁRICAS Y FOLÍCULO DE GRAAF	8
FIGURA No 2 ESQUEMA DEL DESARROLLO FOLICULAR OVÁRICO A FOLÍCULO PRIMARIO B FOLÍCULO SECUNDARIO C FOLÍCULO DE GRAAF D OVULACIÓN E CUERPO LUTEO	17
FIGURA No 3 DESARROLLO DE LA MEIOSIS DESDE LA OVOGÉNESIS QUE SE DESARROLLA EN EL OVARIO FETAL HASTA LA FECUNDACIÓN	22
FIGURA No 4 IMAGEN ECOGRÁFICA DE UN OVARIO CON LOS FOLICULOS (F) Y LÍNEA DE PUNCIÓN (LP) QUE MARCA EL RECORRIDO DE LA AGUJA	56
FIGURA No 5 INSTALACIONES DEL CENTRO DE INVESTIGACIONES EN BIOTECNOLOGÍA AGROPECUARIA	73
FIGURA No 6 HEMBRAS UTILIZADAS EN LA INVESTIGACIÓN	74
FIGURA No 7 EQUIPOS EMPLEADOS EN LA ASPIRACIÓN 1 ECÓGRAFO 2 TRANSDUCTOR 3 BOMBA DE VACÍO 4 GUÍA DE PUNCIÓN 5 CANULA 6 FILTRO DE RECOLECCIÓN 7 TUBERÍA DE SILICONA	75

FIGURA No 8 SEDACIÓN VACIADO RECTAL Y LIMPIEZA DE LOS ANIMALES EMPLEADOS	76
FIGURA No 9 PROCEDIMIENTO REALIZADO EN LA EXTRACCIÓN DE LOS OVOCITOS	77
FIGURA No 10 COLECTA BUSQUEDA Y SELECCIÓN DE LOS OVOCITOS	77
FIGURA No 11 GRADOS DE CALIDAD (UNO DOS TRES Y CUATRO) DE LOS OVOCITOS COLECTADOS	79
FIGURA No 12 GRADOS DE CALIDAD DE LOS COCS POR TRATAMIENTOS	92

## 1 INTRODUCCIÓN

En la actualidad el hombre se ha visto obligado a buscar alternativas que puedan satisfacer la constante demanda de productos alimenticios de origen animal y precisamente en la búsqueda de dichas alternativas es que se han desarrollado las actuales biotecnologías las que han contribuido en el avance de este propósito

Dentro de las biotecnologías de la reproducción la transferencia de embriones bovinos se ha constituido en una importante herramienta en el mejoramiento genético y por ende productivo de los rebaños. La misma a grandes rasgos consiste en la obtención de varios embriones generados por una hembra donante los cuales serán posteriormente transferidos a hembras receptoras (sincronizadas) permitiendo de esta forma incrementar la tasa reproductiva de hembras de excelentes características fecundadas con toros de alta genética

La transferencia de embriones contempla dos variantes utilizadas en la producción de los mismos. La primera y la más común es mediante la aplicación de hormonas a las vacas donadoras para inducir la superovulación y posteriormente lograr la fecundación ya sea mediante monta natural o comúnmente por inseminación artificial. No obstante en la superovulación el principal problema es la gran variabilidad individual en la respuesta de cada animal ya que de todas las donantes que se someten a la sobre-estimulación ovárica entre un 15 y un 20 por ciento no producen embriones transferibles (de

Armas 2007) Sin mencionar que los costos de la misma son bastante elevados pues las hormonas utilizadas encarecen esta práctica

Basado en estos aspectos desfavorables surge como otra alternativa la obtención de embriones por fecundación *in vitro* (FIV) Esta técnica consiste en lograr la fecundación de ovocitos bajo condiciones de laboratorio (fuera del organismo animal) siendo obtenidos estos ya sea de animales destinados al matadero o en animales vivos utilizando la técnica de aspiración folicular Para el caso de los animales de matadero se deben obtener sus ovarios y luego extraer sus ovocitos Sin embargo aunque estos representan la fuente más abundante de ovocitos no garantizan la obtención de embriones a partir de animales individuales ya que se pierde la identificación de la donadora durante el proceso de sacrificio y manipulación de los ovarios en el matadero Por otra parte se elimina la posibilidad de repetibilidad del proceso ya que el animal en cuestión deja de existir después del sacrificio ni tampoco se puede garantizar que estos provengan de hembras de alto valor genético o libres de enfermedades (Nava y Hernández 2005) sin mencionar que ya una vez empleados estos ovarios solo podemos desecharlos

Ante esta situación la obtención de ovocitos de una hembra viva mediante la aspiración folicular transvaginal (Ovum Pick Up OPU) guiada por ecografía parece ser la variante que representa la alternativa más viable para lograr satisfacer las necesidades de ovocitos en un sistema de producción continua de embriones

La aspiración folicular transvaginal es una técnica mediante la cual los ovocitos inmaduros son recolectados de los folículos en los ovarios de una vaca viva por aspiración guiada mediante ultrasonografía a través de la pared vaginal para posteriormente ser llevados a la maduración fertilización cultivo *in vitro* hasta blastocisto

Dicha técnica fue utilizada inicialmente asegura Palma (2008) en ginecología humana y empleada en ganado bovino por primera vez a finales de la década de los 80 Posteriores ensayos llevaron a principios de los 90 hasta un método poco invasivo y con alta repetibilidad para la recolección repetida de ovocitos de vacas donantes vivas

La técnica de aspiración folicular transvaginal guiada por ecografía se adoptó para ser utilizada en donantes vivas y recolectar los ovocitos en forma repetida de novillas seleccionadas y vacas de alto mérito genético (Kruip et al 1994) e inclusive de hembras prepúberes (Nava y Hernández 2005) para producir gran cantidad de terneros con cualidades productivas conocidas acortar el intervalo generacional en los programas de producción de ganado (Palma 2008) También para acelerar las pruebas de progenie de evaluación genética de sementales (Nava y Hernández 2005) Pieterse et al (1988) indicaron que el objetivo prioritario es producir más embriones y preñeces por vaca donante que por medio de la superovulación con los programas convencionales de transferencia de embriones

Hasta hace poco tiempo la aspiración folicular transvaginal era realizada generalmente en momentos aleatorios del ciclo estral (Hendriksen et al 2004



Machatkova et al 2004) Sin embargo la creciente necesidad de mejorar la eficiencia de la técnica de modo que se puedan obtener mayor y mejor calidad de ovocitos apunta hacia el empleo de protocolos previos a la aspiración

El número de folículos disponibles para la aspiración folicular presenta grandes variaciones dependiendo de la fase del crecimiento folicular siendo el inicio de la onda el momento más favorable para la recuperación ya que como menciona De Rover et al (2005) más folículos resultan en más ovocitos

Es por esto que protocolos que permitan sincronizar la onda folicular de modo que se pueda realizar la aspiración al inicio de esta como lo son el empleo de frecuencias de aspiración más cortas y preestimulación hormonal usando benzoato de estradiol y progesterona inyectables son sujeto de nuestra investigación

### **Objetivo General**

- Evaluar dos métodos de sincronización de la emergencia de la onda folicular y dos frecuencias de recolección para la obtención de ovocitos mediante aspiración folicular transvaginal guiada por ecografía y su posterior influencia sobre el ciclo sexual de las hembras tratadas

### **Objetivos Específicos**

- Obtener ovocitos in vivo a partir de hembras de alto potencial genético empleando la técnica de aspiración folicular transvaginal evaluar su calidad

morfológica y en función de esta determinar la aptitud de los mismos para programas de fecundación *in vitro*

- Evaluar dos métodos de sincronización de la emergencia de la onda folicular y determinar su efectividad en programas de aspiración folicular fundamentado en la mayor cantidad y mejor calidad de ovocitos recuperados
- Conocer la frecuencia de recolección en la cual se obtienen mejores resultados de ovocitos colectados tanto en cantidad como en calidad
- Estudiar el efecto de la aspiración folicular sobre la presentación del celo en las vacas tratadas luego de finalizado el periodo de aspiración

### **Hipótesis**

Ho La técnica de aspiración folicular transvaginal guiada por ecografía no garantiza la obtención de ovocitos aptos para fecundación *in vitro*

Ha La técnica de aspiración folicular transvaginal guiada por ecografía garantiza la obtención de ovocitos aptos para fecundación *in vitro*

Ho No existen diferencias entre frecuencias de recolección utilizadas para la obtención de ovocitos por aspiración folicular transvaginal

Ha Existen diferencias entre frecuencias de recolección utilizadas para la obtención de ovocitos por aspiración folicular transvaginal

Ho No existen diferencias entre métodos de sincronización de la onda utilizados para la obtención de ovocitos por aspiración folicular transvaginal

**Ha Existen diferencias entre métodos de sincronización de la onda utilizados para la obtención de ovocitos por aspiración folicular transvaginal**

**Ho Los tratamientos empleados no influyen sobre el retorno del celo en las vacas tratadas luego de finalizado el procedimiento de aspiración**

**Ha Los tratamientos empleados influyen sobre el retorno del celo en las vacas tratadas luego de finalizado el procedimiento de aspiración**

## **2 REVISION DE LITERATURA**

### **A HISTOLOGÍA FUNCIONAL DEL OVARIO**

#### **1 Descripcion General**

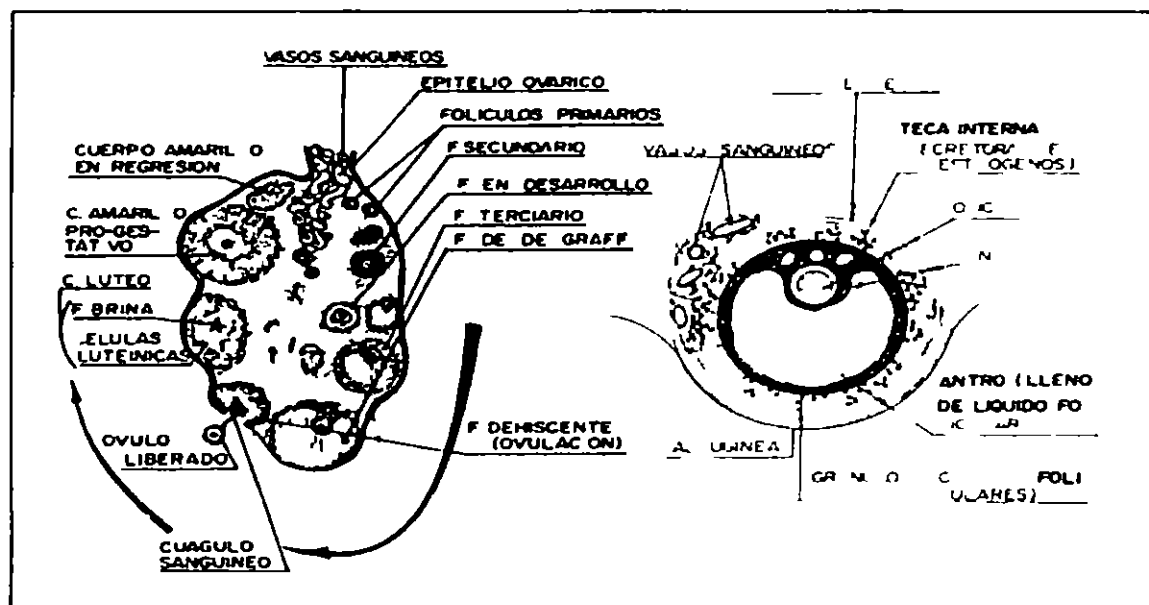
Son los órganos primarios de la reproducción en la hembra. Los ovarios en número par (uno en cada cuerno uterino) pueden ser considerados de naturaleza endocrina y citogénica ya que producen hormonas y producen ovulos (Durán 2007 Frandson et al 2009). Al respecto señala Quintela et al (2006) secreta determinadas hormonas como estrógenos progesterona relaxina inhibina oxitocina factores de crecimiento etc.

El tamaño del ovario varía con el ciclo estral. Generalmente son de forma ovoide y su tamaño promedio es de 3.5 x 2.5 x 1.5 centímetros. Su interior está dividido en dos capas. La médula o porción central del ovario rica en vasos sanguíneos y nerviosos y la corteza o porción externa en donde se encuentran los folículos primarios (Duran 2007) los ovocitos las células secretoras de hormonas (Caravaca et al 2005) e igualmente se pueden observar cuerpos lúteos en desarrollo maduros y cuerpos blancos (Quintela et al 2006).

Se localizan a ambos lados de la entrada o abertura craneal de la pelvis suspendidos del abdomen por el ligamento ancho del peritoneo (Caravaca et al 2005). Asegura Sorensen (1982) en el ganado de carne se encuentran a

menudo en el tejido graso y se hallan en la region pre publica de la cavidad abdominal

FIGURA No 1 OVARIO MAMÍFERO FORMACIONES OVÁRICAS Y FOLÍCULO DE GRAAF



Fuente Buxade et al (1995)

## 2 Folículos

En el momento del nacimiento en la corteza del ovario hay miles de folículos (Caravaca et al 2005) que en los bovinos andan alrededor de unos 200 000 en estado de reposo es decir folículos jóvenes sin desarrollo (Duran 2007)

El folículo es la unidad estructural y funcional de los ovarios (Gigli et al 2006) Aseguran Buxade et al (1995) que cada folículo ovárico constituye en sí mismo una unidad funcional teniendo asociada una célula germinal femenina

El ovario realiza la producción de ovocitos mediante dos procesos estrechamente ligados entre sí denominados folículo-genesis y oogenesis (Caravaca et al 2005)

## **2 1 Folículo-genesis**

La folículo-genesis se define como el proceso de formación crecimiento y diferenciación folicular. Abarca desde el estadio de folículo primordial hasta el de folículo preovulatorio (Gigli et al 2006). La población de folículos se encuentra en un estado constante de crecimiento y maduración distinguiéndose

### **2 1 1 Folículos Primordiales y Primarios**

Son formados durante la vida fetal de la hembra. Están constituidos por una célula germinal rodeada de una capa simple de células (Buxade et al 1995). Al respecto señala Caravaca et al (2005) durante el desarrollo fetal y en el proceso de evolución desde gónadas hasta convertirse en ovario las células germinales primitivas dan lugar por mitosis sucesivas a las células sexuales u ovogonias que por aumento de su masa citoplasmática se convierten en ovocitos de primer orden. Estos se rodean de una sola capa de células epiteliales constituyendo los folículos primarios.

Es decir las células pre granulosas derivadas del epitelio ovárico se diferencian en células granulosas rodeando a los ovocitos I quedando así formados los folículos primordiales. Estos folículos forman la reserva gametogénica o «población de folículos de reserva» que una hembra va a

utilizar en toda su historia reproductiva (Gigli et al 2006) Los folículos primordiales constituyen la reserva o almacén de folículos en reposo los cuales se agotan progresivamente durante la vida (Webb et al 1999 citados por Henao y Trujillo 2000)

Las células planas de la granulosa antes de comenzar a dividirse por mitosis se diferencian en una capa de células de forma cúbica que rodea al ovocito I Cuando esto sucede los folículos se clasifican en folículos primarios (Gigli et al 2006 Findlay 1993 citado por Henao y Trujillo 2000 y Seneda et al 2008)

En esta etapa el ovocito comienza a rodearse de una capa celular amorfa de glicoproteínas denominada zona pelúcida Las células de la teca interna comienzan a rodear por fuera a las células de la granulosa (Gigli et al 2006)

Uno de los pasos más críticos de la folículo-genesis es la transformación de folículos primordiales en primarios Es probable que la conversión de células pregranulosas planas en epitelio cuboidal dependa de señales provistas por el ovocito pero no se conoce la naturaleza de estas señales (Greenhalgh y Roy 1994 citados por Henao y Trujillo 2000) La fase inicial del crecimiento folicular originada a partir de los folículos primordiales presumiblemente es independiente de las gonadotropinas hipofisiarias (Fortune 2003 Webb et al 1999 citados por Henao y Trujillo 2000)

En el momento de la transformación de folículos primordiales en primarios la expresión de tres genes (Nobox Sohlh1 y Lhx8) específicos de los ovocitos de

mamíferos son esenciales para la transformación del folículo primordial en primario (Suzumori et al 2002 Pangas et al 2006) así como diferentes factores secretados por el ovocito y las células foliculares (Picton et al 2008 Rodríguez et al 2008)

En esta etapa el ovocito comienza a rodearse de una capa celular amorfa de glicoproteínas denominada zona pelúcida. Las células de la teca interna comienzan a rodear por fuera a las células de la granulosa (Gigli et al 2006)

## **2.1.2 Folículos Secundarios**

Fundamentalmente formados por una célula germinal rodeada por dos o más capas de células foliculares (Buxade et al 1995). Es decir, las células de la granulosa aumentan de tamaño y número y se denomina folículo secundario al ovocito I rodeado por varias capas de células de la granulosa. Las células tecales se diferencian en una capa externa y otra interna rodeando por fuera a las células de la granulosa. Hasta este estadio los folículos se clasifican en preantrales debido a que aún no se ha formado la cavidad antral (Gigli et al 2006)

↗

Entre la superficie del ovocito y las células de la granulosa adyacentes se originan espacios en los que se deposita un tipo de material fibrilar que representa el inicio de la formación de la zona pelúcida (Totzauer et al 1998 Sinowatz et al 2001). También ocurre un aumento del tamaño del ovocito sin división celular del mismo y una hiperplasia e hipertrofia de las células de la



granulosa dando lugar al folículo secundario. En los folículos secundarios de las especies porcina, murina, bovina y humana se han identificado factores responsables del crecimiento folicular y ovocitario como GDF9 (Factor de crecimiento y diferenciación 9) específico del ovocito y el factor BMP15 (proteína morfogénica ósea 15) ambos están asociados con la proliferación de células de la granulosa (Dong et al. 1996, Dube et al. 1998 y Picton et al. 2008).

Los folículos secundarios presentan un ovocito más grande, un buen desarrollo de la zona pelúcida y por lo menos dos capas de células granulosas. Al final de esta etapa, el papel desempeñado por las gonadotropinas puede ser detectado y las importantes acciones de FSH y LH se inician (Seneda et al. 2008).

### **2.1.3 Folículos Terciarios**

Los folículos terciarios o folículos antrales se caracterizan histológicamente por la presencia de la cavidad antral y por estar rodeados de varias capas cúbicas de células de la granulosa (Gigli et al. 2006). La continua proliferación de las células de la granulosa, regulada en gran medida por los factores GDF9 y BMP15 (Canipari 1994, Kezele et al. 2002) lleva a que estas comiencen a secretar un trasudado que se denomina líquido folicular (Gigli et al. 2006).

Este líquido asegura Buxadê et al. (1995) es rico en estrógenos producido por las células de la granulosa. El folículo requerirá forzosamente del estímulo de la hormona estimulante del folículo (FSH) para proseguir la proliferación de

las células de la granulosa (CG) y establecer en éstas una producción creciente de estrógenos (Hillier 2001 citado por Velazquez y Mendieta 2005) La FSH ha sido considerada como un factor esencial debido a sus funciones endocrinas y paracrinas. Por ejemplo la FSH hace una asociación con la modulación de la familia FGF como el FGF 8 (Buratini et al 2005)

En este estadio las características histológicas son la presencia de la teca interna constituida por tejido conectivo y la teca externa formada por una capa de colágeno atravesada por capilares con miofibroblastos diferenciados de los fibroblastos del estroma. A nivel molecular se caracterizan por una mayor expresión de receptores para FSH en las células de la granulosa. Las células de la teca expresan receptores para LH (Gigli et al 2006)

En el folículo terciario las células de la granulosa se diferencian en dos subpoblaciones: las células de la granulosa que revisten el folículo formando un epitelio estratificado en contacto con la lámina basal y las células del cumulus oophorus que forman varias capas de células cilíndricas alrededor del ovocito (Canipari 1994 Kezele et al 2002). Al respecto señala Gigli et al (2006) que el líquido folicular al acumularse produce un reordenamiento de estas células de la granulosa en células del cumulo y murales.

Las células del cumulus desarrollan procesos citoplasmáticos atravesando la zona pelúcida y forman zonas de contacto con la membrana plasmática del ovocito mediante uniones tipo gap (Eppig y O'Brien 1996 Tanghe et al 2002 Van Soom et al 2002). Estas uniones facilitan el abastecimiento de nutrientes y

el aporte de pequeñas moléculas reguladoras para el ovocito procedentes de las células de la granulosa en un proceso de cooperación metabólica (Canipani 1994)

Los folículos terciarios se clasifican en dominantes y subordinados. Los folículos dominantes a diferencia de los subordinados expresan en las células de la granulosa además de un mayor número de receptores para FSH receptores para LH (Gigli et al 2006). La acción inductiva de la FSH permitirá posteriormente facilitar la respuesta del folículo a la hormona luteinizante (LH) y a otros factores extracelulares (Hillier 2001 citado por Velázquez y Mendieta 2005)

La mayor parte de los folículos que llegan hasta esta etapa experimentan atresia mientras otros siguen desarrollándose para convertirse en folículos maduros también llamados folículos dominantes que han sido seleccionados para continuar su crecimiento. La selección de estos folículos dominantes con capacidad de llegar a lograr la maduración ovocitaria está precisamente determinada por los receptores de LH y FSH localizados en las células de la granulosa (McGee y Hsueh 2000)

#### **2.1.4 Folículo de Graaf**

Según Solís (2006) un folículo terciario que llegue a ser dominante puede tener dos destinos: la atresia o la ovulación. En cuyo caso sea la ovulación este se denomina folículo preovulatorio o como menciona Gigli et al (2006) folículos de

De Graaf en honor a quien fuese el primer científico en examinar ovarios humanos en 1672. La ovulación ocurre siempre y cuando este sea coincidente con el descenso de los niveles de progesterona en el ciclo. Un folículo preovulatorio puede tener un diámetro de hasta 16 mm en la especie bovina (Solis 2006).

Los folículos de Graaf están formados por dos capas de células foliculares o tecas (teca interna y teca externa) separadas por una membrana basal de la cubierta celular interior de granulosa que rodea el antro celular y el oocito. El riego sanguíneo lo reciben por una abundante red capilar (Buxade et al 1995).

El pico de LH es inducido por la elevada concentración circulante de estrógenos producidos por el folículo preovulatorio (Velázquez y Mendieta 2005). Las altas concentraciones de gonadotropinas en el fluido folicular modifican el patrón de síntesis de esteroides de las células de la granulosa y de la teca y preparan al ovocito para la maduración nuclear y citoplasmática (McGee y Hsueh (2000)). Es decir, los folículos preovulatorios tienen la capacidad de responder al estímulo de la LH produciendo cambios morfológicos y bioquímicos, que finalizarán reiniciando la meiosis y desencadenando la ovulación (Gigli et al 2006).

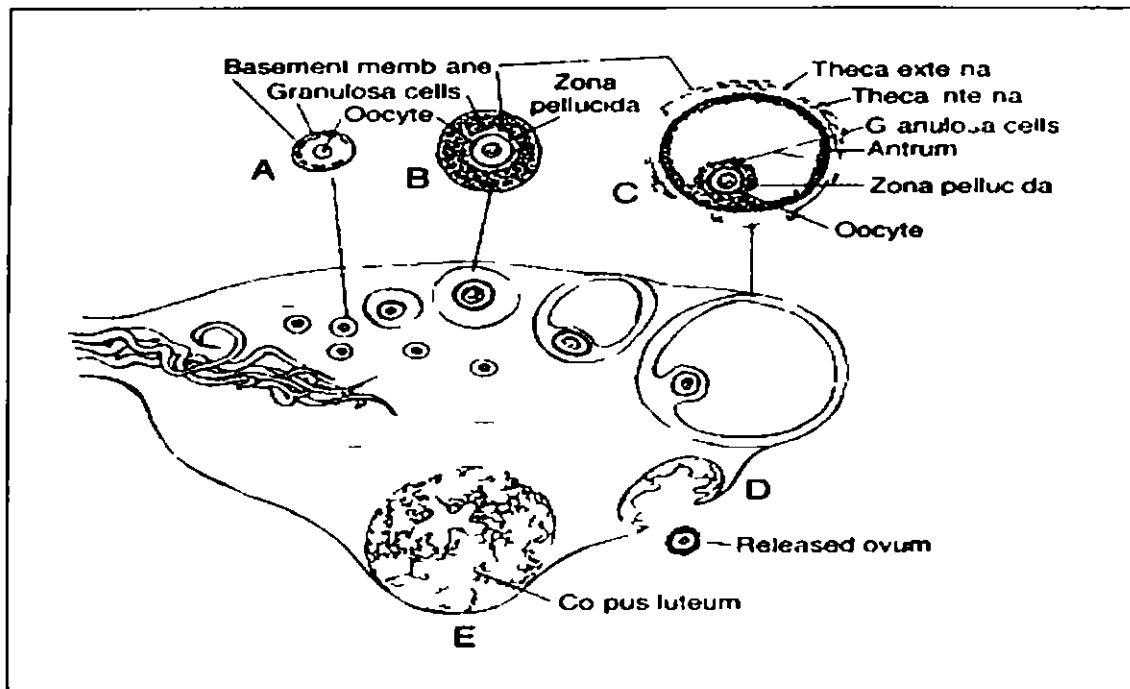
Velázquez y Mendieta (2005) mencionan que el pico de LH además de inducir la reiniciación de los procesos de maduración del ovocito y cambios que provocan la ruptura de la pared folicular que a su vez permite la ovulación también incluye alteraciones funcionales en el complejo ovocito células del

cumulo y modificaciones en la expresión génica de las células de la granulosa que las lleven hacia la luteinización

El ovocito maduro secreta un factor que permite la expansión de las células del cumulo (CEE) que permite secretar ácido hialurónico en respuesta a la estimulación por FSH. Al hidratarse genera espacios entre las células que provocan la expansión del cumulo que precede al proceso de ovulación propiamente dicho (Velázquez y Mendieta 2005)

Los productos proinflamatorios sintetizados por las células de la granulosa y detectados en elevadas concentraciones en los folículos preovulatorios (p.ej. interleucinas (IL) 1 $\beta$  y 6, factor de necrosis tumoral (TNF)  $\alpha$  y prostaglandinas) contribuyen a la disminución de su producción de estrógenos hacia el final de la transición a folículo de Graaf. Este cambio en el patrón esteroidogénico de las células de la granulosa parece inducir junto con la aparición del pico preovulatorio de LH la expresión de las enzimas remodeladoras de tejidos (metaloproteinasas de matriz (MMPs)) indispensables para el proceso de ovulación (Rosenfeld y et al 2001 citados por Velázquez y Mendieta 2005)

FIGURA No 2 ESQUEMA DEL DESARROLLO FOLICULAR OVÁRICO A FOLÍCULO PRIMARIO B FOLÍCULO SECUNDARIO C FOLÍCULO DE GRAAF D OVULACIÓN E CUERPO LUTEO



Fuente Frandson et al (2009)

## 2.2 Ovogenesis

La ovogenesis es el proceso de formación y desarrollo del ovocito (Gigli et al 2006). Este proceso inicia en la vida fetal y continúa después del nacimiento, pasa por una aceleración durante la pubertad y culmina con la ovulación, cuando el ovocito maduro es liberado del folículo (Derivaux 1980). Comienza con las ovogonias que derivan de las células germinales primordiales en el embrión y culmina con la formación del ovocito II (Gigli et al 2006).

En los rumiantes al igual que en la especie porcina y los primates el crecimiento del ovocito se inicia durante el periodo prenatal (Bielanska Osuchowska 2006) En esta etapa las células primordiales germinales tienen su origen extra gonadal en el endodermo del saco vitelino y en la región del alantoides (Eddy et al 1981 Buccione et al 1990) a partir de células somáticas que tienen el potencial de convertirse en células germinales (Kelly 1977) estas migran a través del mesenterio y colonizan las gonadas primitivas del mesonefro (Gigli et al 2006)

Antes de que las células germinales gonadales migren hacia el borde genital se dividen mediante mitosis manteniendo esta actividad durante todo el proceso de migración (Bendel Stenzel et al 1998) Una vez establecidas las células primordiales germinales en el ovario se diferencian en ovogonias por sucesivas divisiones mitóticas Este proceso migratorio se encuentra dirigido por factores quimiotáxicos como el factor transformante del crecimiento  $\beta$  Otras señales como el c Kit y el EGF desempeñan un papel importante en la supervivencia y división de las células germinales durante este proceso migratorio (Dolci et al 1991 Masui 1991) así como en su posterior desarrollo y crecimiento (Manova et al 1993)

Cuando se ha completado el proceso migratorio aquellas oogonias que se encuentran en estadios más avanzados de desarrollo se asocian con las células somáticas en los cordones corticales mientras que el resto entra en apoptosis

sobreviviendo en el momento del nacimiento únicamente el 20 por ciento de las células originales (Baker 1963 Byskov 1986)

Las ovogonias situadas en la periferia del ovario son mas grandes que las células primordiales germinales presentan un nucleo vesicular central con 1-3 nucleolos reticulados y un citoplasma escaso de aspecto claro y pocas organelas (Bielanska Osuchowska 2006 Sathananthan et al 2006) Durante el desarrollo fetal las ovogonias sufren un proceso de diferenciación y sucesiva división mitótica hasta que la ultima generación de ovogonias entra en meiosis (Bukovsky et al 2004) las ovogonias se diferencian en ovocitos primarios cuando comienzan la meiosis En el bovino se observan figuras meioticas a partir del día 82 de gestacion

Las ovogonias se diferencian a ovocitos primarios mediante la primera división meiótica en la que tiene lugar la reduccion del numero de cromosomas a estado haploide Este proceso tiene lugar en el folículo primordial en el que se lleva a cabo el primer paso de la meiosis I que incluye la replicación del ADN y el arresto en el estadio de diploteno de la profase I (estado de dictiato) en lo que se conoce como primera detencion de la meiosis (Jamnongjit y Hammes 2005)

La detención meiótica del ovocito primario está regulada por senales inhibitorias Una de las moléculas intercelulares mas importantes responsables de mantener el arresto meiótico es el AMPcíclico que dentro del ovocito parece actuar como un inhibidor de la maduración aparentemente a través de la acción de proteína quinasa (Conti et al 2002) Al respecto Byskov (1975) Rajah et al (1972) y



Wassarman et al (1976) señalan que factores como el factor citostático y segundos mensajeros como el AMPc mantienen fosforilado el MPF inhibiendo la meiosis hasta el momento de la pubertad

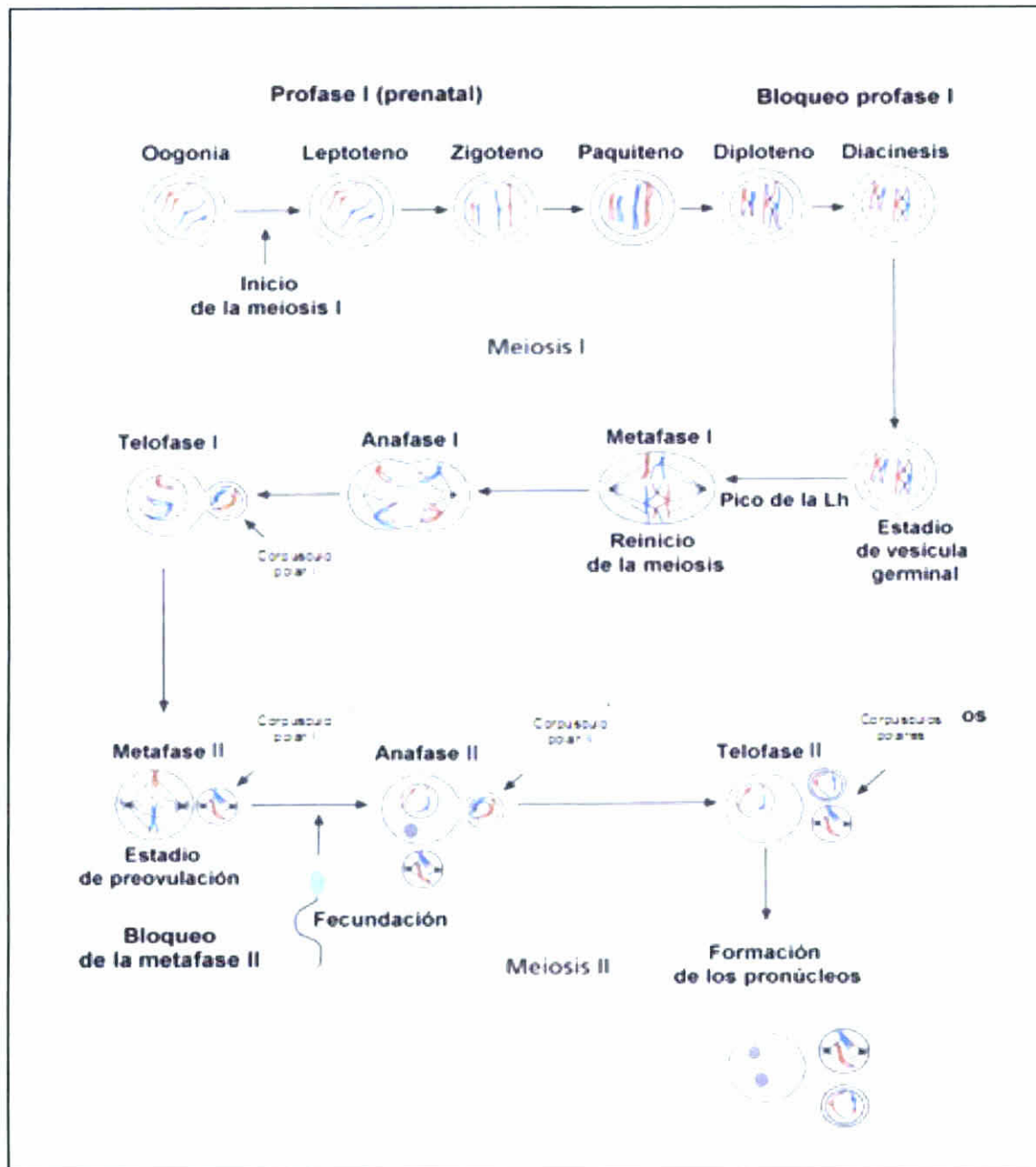
El ovocito primario se caracteriza por la presencia de un núcleo prominente e irregular que recibe el nombre de vesícula germinal así como por la agregación de organelas celulares compuestas predominantemente por mitocondrias aparato de Golgi lisosomas y microtubulos. La meiosis iniciada por el ovocito primario y detenido en la profase I no se reanuda hasta que el folículo se desarrolle totalmente y se produzca la ovulación durante la pubertad por lo que dependiendo de la especie el ovocito puede permanecer en detención meiótica durante semanas o años (Canipari 1994)

El retorno de la meiosis ocurre inmediatamente después de un estímulo hormonal in vivo o simplemente por la retirada del ovocito de dentro del folículo in vitro. En el animal la meiosis inicia nuevamente en los folículos preovulatorios bajo el estímulo de la LH (Gigli et al 2006) durante el pico de LH en el momento de la ovulación (Sorensen et al 1985 Buccione et al 1990)

En este momento los ovocitos sufren progresión nuclear de estadio de diploteno de la profase I de la primera división meiótica a metafase II. La progresión del estadio de diploteno a metafase II es conocida como maduración meiótica. Esa maduración se caracteriza por el rompimiento de la vesícula germinativa condensación de la cromatina separación de los cromosomas homólogos y la expulsión del primer corpúsculo polar. Los cromosomas se organizan en el

mismo plano formando la placa ecuatorial estadio que corresponde a metafase II En este periodo ocurre la segunda intervención de la meiosis que solamente será retomada si el ovocito es fertilizado por el espermatozoide La activación del ovocito por el espermatozoide durante la fecundación estimula la finalización de la meiosis (segunda división reduccional) ocurriendo la separación de la cromatina y la expulsión del segundo corpúsculo polar llegando a la fase final de la ovogénesis (Wassarman 1994 Banks 1991)

FIGURA No 3: DESARROLLO DE LA MEIOSIS, DESDE LA OVOGÉNESIS QUE SE DESARROLLA EN EL OVARIO FETAL, HASTA LA FECUNDACIÓN



### 3 Cuerpo Luteo

Una vez que el folículo de Graaf ha finalizado su maduración y que el ovocito se ha preparado durante el proceso de la ovogénesis ocurre la ovulación (Caravaca et al 2005). El pico de LH preovulatorio provoca la ruptura del folículo destinado a la ovulación (Gordon 1996). Se da entonces la ruptura del folículo de Graaf así como del propio epitelio del ovario y en el desprendimiento del ovocito que irá a parar en el infundíbulo. En los rumiantes y en la cerda se libera un ovocito de segundo orden y en la yegua un ovocito de primer orden por eso es más adecuado llamar este proceso ovulación en lugar de ovulación como se ha venido llamando tradicionalmente (Caravaca et al 2005).

Con la ruptura del folículo maduro y la liberación del óvulo se produce una pequeña hemorragia con formación de un coágulo de sangre en la cavidad antral ahora vacía. A esta estructura se le denomina cuerpo hemorrágico (Buxadé 1995). A continuación aseguran Caravaca et al (2005) se produce una organización del coágulo aumentando de tamaño y con un citoplasma rico en lipocromos (xantofilas) que dan una coloración amarillenta por lo que esta estructura recibe el nombre de cuerpo amarillo o cuerpo luteo. Este proceso se llama luteinización.

Las células de la granulosa que recubren la cavidad folicular vacía comienzan a multiplicarse bajo la influencia de la LH y a formar el cuerpo luteo. La mayoría de las células de cuerpo luteo se derivan de células de la granulosa pero algunas células en el cuerpo luteo se derivan de la teca interna (Frandsen et al 2009).

Por su parte Gordon (1996) señala se cree que las células luteas se diferencian en células luteas grandes y pequeñas. Las grandes células secretan progesterona y la oxitocina y responden a la prostaglandina E mientras que las pequeñas células secretan progesterona y responden a la LH. Las células pequeñas derivadas de la teca son más numerosas que las células grandes que son al menos en parte derivadas de células de la granulosa (Hansel et al 1991). Se cree que las dos hormonas que regulan principalmente la función del cuerpo luteo (LH y PGF) actúan sobre los dos tipos de células a través de diferentes vías de segundo mensajero (Wiltbank et al 1991). La evidencia disponible indica que la LH tiene un papel importante en el establecimiento de un cuerpo luteo completamente funcional en la vaca pero no está obligado a mantener su función (Peters et al 1994).

Como se ha visto el cuerpo luteo ovarico es un órgano endocrino que produce progesterona. La cual es considerada su principal producto de secreción. Los niveles de progesterona en sangre incrementan con el crecimiento del cuerpo luteo. Cuando el cuerpo luteo está completamente desarrollado la secreción de progesterona es máxima y se estabilizan los niveles plasmáticos (Frandsen et al 2009).

Una cantidad detectable de progesterona se puede encontrar menciona Gordon (1996) de tres a cuatro días después de la formación del cuerpo luteo el cual puede verse por ecografía después de tres a cuatro días (Descoteaux et al 2010) o de dos a tres días asegura Tamayo (2000) posteriores a la ovulación y

puede llegar a constituir muchas veces mas de 2/3 partes del tamaño total del ovario cuando se encuentra en su máximo desarrollo que alcanza de los nueve a 12 días del ciclo (Holy 1987) La producción diaria de progesterona aumenta marcadamente durante varios días hasta que una meseta de secreción se alcanza alrededor de ocho días del ciclo (Gordon 1996)

Si la fertilización del ovulo no se da y el embarazo no se ha establecido el cuerpo luteo entra en regresión espontánea con una disminución relativamente rápida de la progesterona en plasma (Frandsen et al 2009) al final del ciclo estral uno a cuatro días antes del inicio del celo (Gordon 1996) La concentración declina en un periodo aproximadamente de dos días a un valor insignificante que mantiene a través del celo y hasta que se forme un nuevo cuerpo luteo en la próxima ovulación (Gordon 1996)

El intervalo de tiempo entre la progesterona alcanza su concentración mínima y el inicio del celo puede variar en función de varios factores incluyendo la presencia de un folículo dominante condición corporal el estrés la temporada y probablemente la lactancia y la nutrición (Gordon 1996)

Asegura Gordón (1996) que la rápida regresión del cuerpo luteo de la vaca es un evento clave en el ciclo estral bovino que implica asegura Frandsen et al (2009) la muerte por apoptosis de las células luteas y su eliminación El útero es el órgano que determina la regresión del cuerpo luteo a través de la secreción de la hormona luteolítica prostaglandina F<sub>2α</sub> (PGF<sub>2α</sub>) (Gigli et al 2006)

Ahora esta bien establecido que la prostaglandina liberada en el endometrio durante la fase lutea tardia es responsable de la luteolisis y la consecuente caida dramatica en las concentraciones de progesterona que prepara el escenario para una nueva ovulación. La prostaglandina liberada durante el ciclo estral bovino es estimulada por la oxitocina lutea despues de unirse a un receptor especifico en la célula endometrial (Gordon 1996)

La  $\text{PGF}_{2\alpha}$  actuaría sobre el cuerpo luteo por dos mecanismos. Por un lado estimula a las células luteales grandes a secretar oxitocina produciendo un mecanismo de retroalimentación positiva al estimular la liberación de mas  $\text{PGF}_{2\alpha}$  por parte del endometrio. El segundo mecanismo consiste en regular directamente su propia síntesis estimulando a las células tecales a producir  $\text{PGF}_{2\alpha}$  (Silvia 1999). Este ultimo mecanismo se encuentra activo en el CL del bovino a partir del día cinco. Esto explicaria por que con una sola inyección de  $\text{PGF}_{2\alpha}$  antes del día cuatro no se produce luteolisis pero dosis repetidas o una sola inyección a partir del día cinco si induce la regresión del cuerpo luteo (Tsai y Wiltbank 1998).

Además de la  $\text{PGF}_{2\alpha}$  otras hormonas participan de la lisis del cuerpo luteo. Los estrógenos tienen un efecto positivo sobre el utero en su habilidad de liberar  $\text{PGF}_{2\alpha}$ . Pero es necesario que la progesterona haya actuado previamente sobre las células endometriales. Los estrógenos tienen un feedback positivo sobre ellos mismos al aumentar sus propios receptores en endometrio ademas producen el aumento de los receptores para oxitocina. Se reconoce entonces

que el cuerpo luteo posee receptores para oxitocina y para estradiol (Kimball y Hansel 1974) sugiriendo que los estrógenos tendrían una acción directa sobre la lisis del cuerpo luteo

Unos días antes de la siguiente ovulación se produce una cicatrización y sustitución del cuerpo luteo por tejido conectivo apareciendo una costra blanca sobre la superficie del ovario que se denomina cuerpo blanco o albicans (Caravaca et al 2005 y Frandson et al 2009) A parte de la eliminación del tejido luteo y la recuperación de la forma y tamaño anterior no se conoce otra función del cuerpo albican (Ospina y Aldama 1995)

Por otra parte si se realiza el apareamiento y la vaca queda preñada el mecanismo de liberación de prostaglandinas se suprime (Gordon 1996) el reconocimiento materno de la gestación se produce y la regresión del cuerpo luteo se previene (Frandson et al 2009)

La función básica de la progesterona durante este momento es preparar al organismo para un embarazo La progesterona aumenta la secreción de las glándulas del útero e inhibe la motilidad uterina para promover la implantación y mantenimiento de la preñez La progesterona también promueve el desarrollo de la glándula mamaria Los altos niveles de progesterona actúan sobre el eje hipotálamo adenohipofisario para inhibir la secreción de LH (Frandson et al 2009)



## B DINÁMICA FOLICULAR DURANTE EL CICLO ESTRAL DEL BOVINO

Numerosos autores concuerdan que fue en el año de 1960 cuando Rajakoski propuso por primera vez la existencia de dos ondas de desarrollo folicular en el bovino. Iniciándose la primera onda en el día tres y finalizando a mediados del ciclo con el inicio de la segunda onda que culminaría con la ovulación (Gordon 1996, Palma 2001 y Quintela et al 2006).

A finales de la década de los 80 y comienzo de los 90 con el empleo de la ultrasonografía en el estudio de la funcionalidad ovárica en la especie bovina se logró poner de manifiesto que a lo largo del ciclo estral existen varias oleadas u ondas de crecimiento folicular generalmente dos o tres (Gordon 1996, Bo y Mapletoft 1999, Fricke 2001, Noakes 2001, Gigli et al 2006) aunque en ocasiones pueden ser hasta cuatro (usualmente cuando los animales presentan genética cebu). Estas ondas también se han observado en hembras pre-púberes, anéstricas y preñadas (Evans et al 1992, Hopper et al 1993) e incluso en becerras tan jóvenes como de dos semanas de edad (Evans et al 1992).

~

Se definió a la onda folicular como la activación y crecimiento simultáneo de un grupo de folículos terciarios que emergen continuando uno de ellos su crecimiento y diferenciación (folículo dominante) mientras que los otros (folículos subordinados) se atresian (Gigli et al 2006). La emergencia del grupo o cohorte de pequeños folículos antrales inicia justo antes del día de la ovulación y

fase de selección (Quintela et al 2006) El folículo dominante alcanza un diametro mayor a 10 mm (Lucy et al 1992 Adams et al 1993) aproximadamente de 10 a 15 mm y permanece dominante por un periodo de cinco a siete días (Diaz 1999) hasta que se hace atresico o se vuelve pre ovulatorio El folículo preovulatorio o de Graaf puede medir alrededor de 15 a 17 milímetros (Bo y Caccia 2000) 11 a 16 milímetros (DesCoteaux 2010) de diámetro

La primera onda de desarrollo folicular se detecta el día de la ovulación (d 0) La segunda onda comenzara el día nueve o 10 para los ciclos de dos ondas y los días ocho o nueve en los ciclos de tres ondas En los ciclos del tres ondas la tercera onda emerge los días 15 o 16 (Bo 2002) No obstante hay una gran variación individual principalmente en la segunda onda y esta puede comenzar mas temprano (d 6) o mas tarde (d 12) (Bo y Mapletoft 1999) En cuyos casos se han encontrado animales con cuatro ondas la cuarta onda comienza el día 20 o 21 y este ciclo tendrá una duración mayor a 21 días (Bo et al 2002)

Los primeros reportes usando ultrasonido indicaron que el número de ondas foliculares que ocurren en vaquillas cíclicas varía entre animales Algunas vaquillas exhibían dos mientras que otras exhibían tres ondas sucesivas de crecimiento folicular durante cada ciclo estral (Savio et al 1988 Sirois y Fortune 1988 Ginther et al 1989 Taylor y Rajamahendran 1991) En general las vacas lecheras en lactancia primíparas y multíparas tienden con mayor frecuencia a exhibir ciclos de dos ondas mientras que las vaquillas lecheras

nuliparas tienden con mayor frecuencia a exhibir ciclos de tres ondas. Sin embargo, un animal que presente un ciclo de dos ondas puede exhibir tres ondas durante el subsecuente ciclo y viceversa, pero la frecuencia con la cual este cambio en el número de ondas por ciclo se presente dentro de un animal no ha sido bien establecida. Varios factores que influyen el número de ondas por ciclo estral incluyen la ingestión dietética (Murphy et al. 1991), edad, paridad y estado de lactancia (Lucy et al. 1992).

La duración del ciclo estral va a estar relacionada con la cantidad de ondas (Bo 2002). El número de ondas de crecimiento folicular durante el ciclo estral es determinado por la longitud de la fase luteal: si la progesterona declina mientras el folículo dominante de la segunda onda está en la fase de crecimiento post-desviación o en su fase estática temprana (tres a cuatro días después de su desarrollo máximo) este folículo ovulará; sino sufrirá atresia y se originará una nueva onda (Lucy et al. 1992). Así, el principal factor que condiciona la duración del ciclo y por lo tanto la existencia de dos, tres o cuatro ondas por ciclo parece ser la vida del cuerpo luteo (Fernández 2003). Consecuentemente, la duración del ciclo de dos ondas es de 18 a 20 días, de 21 a 23 días en los ciclos de tres ondas (Bo 2002) y 24 o 25 días en los ciclos de cuatro ondas (Zeitoun et al. 1996, Bo 2002).

## **1 Factores que Regulan la Dinámica Folicular**

Resultados de experimentos establecieron que el mecanismo que regula la dinámica folicular está basado en respuestas diferenciales de los folículos a la

FSH y LH (Ginther et al 1996) A diferencia de los folículos de las anteriores fases de la foliculogénesis los folículos antrales o terciarios son sensibles a los estímulos gonadotróficos hasta convertirse en folículos maduros (Henao y Trujillo 2000)

Algunos trabajos han demostrado que alrededor del momento del celo hay dos picos de FSH muy cercanos entre sí. El primero ocurre al mismo tiempo que el pico preovulatorio de LH y es inducido por la liberación de GnRH desde el hipotálamo. El segundo pico ocurre cerca del momento de la ovulación y es aparentemente responsable del reclutamiento de los folículos de la primera onda folicular (Turzillo y Fortune 1990 Palma 2001 Dias 1999). De igual manera las otras ondas de crecimiento folicular surgen a consecuencia de un aumento transitorio en la secreción de FSH (Sunderland et al 1994 Adams et al 1992)

Una vez que el crecimiento ha comenzado se requiere la presencia de gonadotrofinas (Gong et al 1996 Lussier et al 1994) además de hormonas esteroides (Monget y Monniaux 1995) péptidos intraováricos tales como la activina la follistatina (Findlay 1994) y la inhibina (Martin et al 1991) y factores de crecimiento (Monget y Monniaux 1995) para que la dinámica se lleve a cabo

La FSH induce la división de las células de la granulosa mediante síntesis de la ciclina D. En un momento determinado de su desarrollo en la décima generación de las células de la granulosa el folículo ha de escoger entre sus dos posibles destinos la atresia o la ovulación (Ginther et al 1996 Cox 1997)

Aun no se ha aclarado por completo el mecanismo de selección del folículo dominante. Al mismo tiempo que los perfiles de crecimiento del folículo dominante y de los subordinados comienzan a diferenciarse, la FSH declina rápidamente. Esta situación propicia que los niveles de FSH se encuentren por debajo de los niveles necesarios para el desarrollo de los folículos subordinados que sufren atresia, mientras el folículo dominante adquiere la habilidad de seguir creciendo con bajos niveles de FSH (Ginther et al 1996).

La razón por la cual el folículo dominante puede crecer con bajos niveles de FSH, mientras que los subordinados se atresian, puede estar relacionada con la síntesis de receptores para LH en las células de la granulosa del folículo dominante (Ginther et al 1996). Todos los folículos poseen receptores para LH en las células de la teca y de FSH en las células de la granulosa, pero solo el folículo dominante adquiere receptores de LH en las células de la granulosa. Estos receptores aumentan abruptamente a partir del día cuatro cuando el folículo dominante tiene más de ocho milímetros de diámetro (Xu et al 1995). En los folículos donde esto se ha realizado, la LH actúa induciendo la síntesis de grandes cantidades de estrógenos en sinergia con la FSH. Este proceso es un auto refuerzo en el que los estrógenos inducen la formación de más receptores de LH y ésta y la FSH producen una nueva secreción de estrógenos (Fernández 2003).

La hipótesis más aceptada sobre la dominancia es la que indica que se produce por medio de algún factor que tiene un efecto de retroalimentación negativa.

sobre la secreción de gonadotrofinas entre los que destacan la inhibina folistatina (Fernandez 2003) y el estradiol (Bo 2002). La inhibina producida primariamente por las células de la granulosa (Fernandez 2003) aparentemente secretada por todos los folículos en desarrollo (Bo 2002) y de alta producción en el folículo dominante actúa localmente (acción paracrina) inhibiendo el desarrollo de los folículos subordinados y en forma sistémica por un mecanismo de retroalimentación negativo a la FSH a nivel de la hipófisis (Gigli 2006). La folistatina producida por el folículo dominante proteína que tiene alta afinidad de unión por la activina proteína esta última que eleva la secreción de FSH por su unión a la activina la folistatina reduce la secreción de FSH (Fernandez 2003). El estradiol  $17\beta$  producido principalmente por el folículo dominante asegura Bo (2002) también produce la disminución de la FSH.

Por otro lado los factores de crecimiento tipo insulínico (IGF I II) producidos por las células de la granulosa y teca (Watson et al 2004) amplifican la respuesta desencadenada por la FSH (Gigli 2006) principalmente los IGF I (Fernández 2003). Aunque no se han establecido diferencias claras en las concentraciones de IGF entre los folículos dominantes o subordinados se sabe que existe regulación múltiple de la actividad de IGF mediante proteínas ligadoras de IGF (IGFBP) que fijan y secuestran los mismos de modo que se ha demostrado que existe mayor concentración de IGFBP en los folículos subordinados que en el dominante. Este hallazgo es consistente con la hipótesis que plantea que los folículos dominantes pueden emplear de manera más efectiva los niveles existentes de FSH debido al aumento de disponibilidad de

los IGF y que la atresia de los folículos subordinados es producto de una reducción inducida por las IGFBP sobre los IGF (Fernández 2003)

Fricke (2001) señala que el papel fisiológico de folículos dominantes no ovulatorios durante la fase lutea del ciclo estral bovino es incierto. La administración de hCG en presencia de un folículo dominante en fase lutea resulta en ovulación y subsecuente formación de un cuerpo luteo (Price y Webb 1989, Fricke 2001) indicando que los folículos dominantes presentes durante la fase lutea temprana y media del ciclo son capaces de ovular y formar una estructura lutea. Los folículos dominantes no ovulatorios pueden jugar un papel durante la regresión lutea (Thatcher et al 1989). El electrocauterio de todos los folículos visibles y los rayos x en el ovario para detener el crecimiento folicular el día 10 del ciclo estral demora la regresión lutea en vacas (Fogwell et al 1985). Por lo tanto la ausencia de un folículo dominante durante la fase lutea media tardía demora la regresión lutea. La mayor secreción de estradiol  $17\beta$  por folículos dominantes del ciclo tardío puede causar regresión lutea estimulando la secreción de  $\text{PGF}_{2\alpha}$  ovárica o uterina (Fogwell et al 1985).

La involución del primer folículo dominante a mitad del ciclo es debida a un efecto de retroalimentación negativa de la progesterona producida por el cuerpo luteo sobre la secreción de LH. La baja frecuencia de los pulsos de LH durante la fase luteal no es suficiente para mantener el crecimiento continuo y la función del folículo dominante (Savio et al 1993).

En las ondas foliculares no ovulatorias las concentraciones de estradiol circulante se mantienen bajas lo cual indica que a pesar de que el tamaño preovulatorio puede ser alcanzado el folículo dominante no alcanza las características funcionales preovulatorias tales como la producción óptima de estradiol (Ginther et al 2003) El folículo dominante (folículo estrogénico activo) de la última onda continúa su crecimiento y la biosíntesis de estradiol hasta que se alcanza el nivel suficiente de estradiol circulante para producir el feedback positivo sobre el área de control cíclico del hipotálamo que aumenta los pulsos de GnRH/LH/ FSH e inducen el pico preovulatorio de LH y FSH y por lo tanto el proceso de la ovulación (Gigli et al 2006)

Por lo tanto en un ciclo estral fisiológico el factor fundamental que determina el destino del folículo dominante (ovulación o atresia) es el nivel de progesterona cuando este folículo finaliza su fase de crecimiento. De esta manera cuando los niveles de progesterona son elevados (fase lútea del ciclo) se produce la regresión del folículo dominante. Mientras que en la fase folicular del ciclo sin el freno de la progesterona el destino del folículo dominante es la ovulación (Fernandez 2003)

## **C ULTRASONOGRAFÍA Y SU EMPLEO EN REPRODUCCIÓN BOVINA**

Es una técnica en la que se emplea ondas de sonido de alta frecuencia para producir imágenes de los tejidos blandos y órganos internos las cuales podemos visualizar a través de la pantalla del ecógrafo (Tamayo 2000) Su



aplicacion en bovinos y equinos a partir de la década del 80 ha sido uno de los pasos mas importantes para el estudio y comprension de los eventos normales que ocurren durante el ciclo estral y la gestacion a tal punto que es considerado por muchos investigadores como el avance más importante en la biologia reproductiva (Bo y Caccia 2000)

Los primeros estudios detallados de las imágenes ultrasonograficas de los ovarios utero preñez temprana y patologia uterina fueron realizados en los ultimos anos de la decada del 80 Además la ultrasonografia fue utilizada como técnica para estudiar la dinámica folicular en el ovario durante el ciclo estral para evaluar el efectos hormonales sobre la poblacion de folículos de los ovarios y mas recientemente para realizar aspiracion guiada de folículos (Ovum pick up) En el macho ha sido empleada para el diagnostico de patologias de testiculo epididimo y glandulas anexas (de la Sota et al 2003)

## **1 Principios**

La ultrasonografia utiliza ondas de sonido de alta frecuencia medidas en Megahertz (1 MHz = 1 000 000 de ondas de sonido por segundo) para producir imagenes de los tejidos blandos y órganos internos (Bo y Caccia 2000)

Los sonidos son el resultado del recorrido de la energia mecánica a traves de la materia en forma de una onda que produce alternativamente los fenómenos de compresión y rarefraccion Se definen por tres características frecuencia de vibración longitud de onda y velocidad de propagacion

- Frecuencia es el numero de ciclos completos por unidad de tiempo y se mide en Hertzios (Hz) de manera que un Hz = 1 ciclo por segundo
- Longitud de onda es la distancia entre el comienzo o pico de la compresión de un ciclo y el siguiente
- Velocidad es la rapidez con la cual las ondas de sonido viajan a traves de un medio especifico (velocidad = frecuencia x longitud de onda)

Los ultrasonidos se definen como sonidos con una frecuencia mayor de 20 000 ciclos por segundo (20 000 Hz) es decir que se encuentran por encima de los limites audibles Las frecuencias que usualmente se utilizan en animales estan entre  $1 \times 10^6$  y  $10 \times 10^6$  (1 a 10 MHz) (Quintela et al 2006)

Las maquinas de ultrasonido están compuestas de forma general por el transductor y la consola El transductor esta integrado por una gran cantidad de pequenos cristales que vibran al ser estimulados por la corriente electrica proveniente de la consola resultando en la emisión de ondas de sonido que viajan a través de los tejidos en diferentes ángulos de acuerdo a la orientacion dada al transductor (Bo y Caccia 2000) El transductor puede ser lineal dando una imagen <sup>de</sup> rectangular en la pantalla (barrido de matriz lineal) o sectorial donde la imagen será en triangulo (registro sectorial) (Quintela et al 2006) Luego los tejidos tendrán la capacidad de reflejar o propagar las ondas de sonido y el eco resultante será recibido por los cristales que transformaran las vibraciones en corriente eléctrica que irá a la consola para ser luego transformada en imagenes (Bo y Caccia 2000)

Esta imagen se observa en la pantalla de acuerdo a la densidad o dureza del tejido examinado en una variedad de tonos que van desde el negro (color como se observan los líquidos) al blanco (los huesos y tejidos muy densos) incluyendo una amplísima gradación de tonos grises (cuerpo lúteo estroma ovárico etc ) (Perea 2005)

Con el descubrimiento de ciertos materiales (cuarzo turmalina etc ) que al aplicarles energía mecánica producían cargas eléctricas se facilitó la emisión y recepción de ondas de ultrasonido Este efecto se denominó piezoeléctrico y también funciona en sentido inverso de forma que al aplicar un campo eléctrico a estos materiales se producían tracciones y compresiones (sonido) Con este descubrimiento de una forma simple y en un reducido espacio se podría construir emisores de ultrasonido (Quintela et al 2006)

Ya que los ultrasonidos no se propagan en el vacío precisan de un medio para propagarse No todos los medios tienen la misma capacidad de propagarlos y para valorar esta capacidad surge el término de impedancia acústica Esta es la capacidad de diferentes medios de resistir o impedir la transmisión del sonido Varía ligeramente entre la mayoría de los tejidos dependiendo de la densidad y elasticidad de los mismos pero permite distinguir un tejido de otro siempre que se transmita parte del sonido de modo que las estructuras llenas de aire y óseas son barreras para las ondas de ultrasonido (Quintela et al 2006) en tanto que las estructuras llenas de líquido o tejidos blandos permiten la propagación de las ondas de ultrasonido

Las ondas que atraviesan los tejidos son muy delgadas (2 mm) por lo tanto la imagen producida es equivalente a un corte histológico. Los límites entre dos tejidos adyacentes de distintas densidad se denominan interfaces. Diferencias muy pequeñas de densidad pueden resultar en una interface (Bo y Caccia 2000). Las interfaces entre los tejidos blandos y el aire o entre los tejidos blandos y el hueso hacen que la impedancia acústica sea muy diferente (Quintela et al 2006). Por lo tanto las interfaces nos permiten delimitar los órganos en estudio y las distintas densidades posibilitan hacer una evaluación de los cambios normales o anormales de dichos órganos (Bo y Caccia 2000).

Para describir la textura de los tejidos en una imagen ecográfica existe una terminología específica. Ecogénico o ecoico significa que la mayor parte del sonido se refleja hacia el transductor y estas áreas aparecen de color blanco en la pantalla (huesos, aire). Anecogénico se emplea para describir el tejido que transmite todo el sonido hacia tejidos más profundos, no reflejando ningún sonido hacia el transductor. Estas áreas se ven de color negro en la pantalla y suelen corresponder con estructuras llenas de líquido. Los tejidos blandos no solo se representan en blanco y negro, sino que como se mencionó, también pueden aparecer distintas escalas de grises. Así, hiperecico define a los tejidos que reflejan más sonido que el tejido circundante, e hipoeico describe la idea contraria. Isoecoico se utiliza para definir los tejidos que muestran la misma ecogenicidad que los tejidos circundantes (Quintela et al 2006).

A medida que los ultrasonidos avanzan por los tejidos van perdiendo intensidad (atenuación). El sonido que viaja a través de los tejidos está sujeto a la atenuación. Esto limita la profundidad de la imagen. Este grado de atenuación depende de la frecuencia del transductor; así, el sonido emitido por un transductor de alta frecuencia se atenúa más rápidamente que uno de frecuencia más baja y por tanto este último puede llegar a tejidos más profundos. Sin embargo, a mayor frecuencia, menor penetración pero mejor imagen y viceversa (Quintela et al. 2006).

Las frecuencias más comúnmente usadas en la evaluación de los órganos reproductivos de grandes animales como la vaca son 3,5, 5,0 y 7,5 MHz. Las estructuras relativamente pequeñas como los folículos ováricos localizados más próximos del transductor se pueden estudiar con una frecuencia entre 5,0 y 7,5 MHz. Por el contrario, grandes estructuras localizadas cerca del transductor tales como fetos y úteros de mediana y avanzada gestación se observan mejor con frecuencias de 3,5 MHz (Perea 2005).

## **2 Aplicación**

Actualmente la ultrasonografía es empleada eficazmente como una herramienta de diagnóstico en las diferentes especies de animales, siendo el diagnóstico reproductivo uno de los principales campos. En la hembra bovina existen una gran cantidad de aplicaciones prácticas de modo que se mencionan a continuación algunas de las más relevantes.

## **2 1 Determinacion del Estado Funcional Ovarico**

El examen ecografico de los ovarios es util para el control del reinicio de la actividad ovarica posparto para identificar el momento del ciclo en que se encuentra la vaca para prever el resultado de los tratamientos de induccion y sincronizacion de celo optimizar los tratamientos de superovulación y diagnosticar la presencia de estructuras patologicas (Quintela et al 2006)

Los folículos ovaricos como cualquier estructura que esta llena de liquido aparecen en la pantalla del ecógrafo como áreas de color negro también denominadas no ecogenicas Los folículos en general tienen forma redondeada pero tambien pueden presentarse formas mas irregulares generalmente debido a la compresión de los folículos adyacentes al cuerpo luteo o a la compresión entre los folículos y el estroma ovarico Las paredes que separan los folículos pueden ser muy delgadas y en consecuencia dificiles de distinguir A veces la presencia de dos folículos adyacentes y del mismo tamaño da la impresión de estar en presencia de un folículo grande e irregular Las medidas de los folículos son en realidad las medidas del antro folicular ya que no se incluye el espesor de la pared Esto es conveniente debido a que es mucho mas fácil distinguir el borde entre el antro y la pared folicular que el limite entre la pared folicular y el estroma del ovario (Bo y Caccia 2000)

El cuerpo luteo se muestra evidente utilizando sondas de 5 0 y 7 5 megahertz de doble frecuencia (Roa y Castillo 2006) Se muestra evidente en imagenes ecográficas alrededor de los dos a tres dias posteriores a la ovulación Esta

estructura es hipoecogenica en la vaca algo oscura y redondeada con 1.5 a 3.5 centímetros de tamaño en correspondencia con los estadios del cuerpo luteo hemorrágico maduro o en regresión (Tamayo 2000). Este se mostrara como una imagen en forma circular con una cabeza mas o menos prominente sobre la superficie del ovario. En su interior se puede apreciar una pequeña cavidad con líquido (anecogenica) o bien una banda blanca (hiperecogenica) que lo atraviesa de un extremo a otro (Quintela et al 2006).

En investigaciones realizadas entre el 30 y 80 por ciento de los CL presentan cavidad central de dos a 20 milímetros de diámetro con zona anecogenica oscura probablemente conformada por el líquido folicular del folículo que originó al cuerpo luteo y rodeada por tejido luteal. En estos casos los cuerpos luteos son fisiológicos. La concentración de progesterona y el porcentaje de gestación no muestran diferencias significativas en vacas con cuerpos luteos con cavidad en comparación con los que tienen cuerpos luteos compactos (Tamayo 2000).

En hembras superovuladas también podemos evaluar la presencia de cuerpos luteos pero cuando la respuesta es superior a 10 ovulaciones por ovario es difícil precisar el número de ellos. Sin embargo la ecografía nos permite hacer una valoración mas precisa de la respuesta superovulatoria, determinar la presencia de folículos anovulatorios y descubrir estados patológicos cuya información es fundamental para decidir si se efectúa o no la recolección de ovocitos/embriones (Tamayo 2000).

## **2.2 Diagnostico Precoz de la Gestacion y Determinacion del Tiempo de Gestacion**

La detección precoz de la gestación en los rodeos lecheros es la práctica más utilizada de la ultrasonografía reproductiva. En tanto que en rodeos de cría esta siendo rápidamente incorporado debido a sus beneficios: precocidad, inocuidad y seguridad diagnóstica. Es así que a partir de los 25-28 días post inseminación es posible detectar el saco gestacional con alta precisión (95 por ciento) y con mínimo riesgo de pérdida debido a la escasa o nula manipulación del aparato genital (Boyezuk 2007).

En la práctica hemos podido comprobar que para realizar un buen diagnóstico y afirmar con una probabilidad de 100 por ciento la gestación es necesario haber observado los siguientes signos: dilatación del cuerno uterino con contenido líquido, membranas fetales, embrión y latido cardíaco (Quintela et al 2006).

De acuerdo con Pierre et al (1997) es difícil detectar el embrión antes del día 20 postfertilización. Debido a que todavía al día 20 mide apenas cuatro milímetros (Quintela et al 2006). En la práctica ultrasonográfica a partir del día 25 se puede observar el cuerpo embrionario mientras los latidos del corazón nos indican que vive (Boyezuk 2007).

Las investigaciones al respecto revelan imágenes de la dinámica embrionaria y fetal en rangos de 3.5 a 4.0 milímetros alrededor del día 22 hasta 64.5 a 67.5 milímetros a los dos meses de preñez. La morfología del embrión se transforma



de una fina linea a una forma de herradura entre los dias 20 a 25 pero luego se aprecia en forma de L mayuscula aproximadamente en la quinta semana (Quintela et al 2006) En este momento también es posible realizar las mediciones correspondientes comprobar si es normal su desarrollo y detectar la presencia de uno o mas embriones (Pierson et al 1993)

El cordón umbilical es visible desde la sexta semana En la séptima semana ya es posible distinguir las pezunas y comienzan a producirse los primeros movimientos fetales A partir de este momento y conforme nos aproximamos a los 55 a 60 días aparecen los primeros centros de osificacion (Quintela et al 2006)

### **2 3 Determinacion del Sexo Fetal**

La determinacion de la gestación es una operación que requiere tiempo y paciencia (Curran et al 1989 Hanzen et al 1991 Badtram et al 1991 y Rajamahedran et al 1994)

El fundamento de la determinación del sexo se basa en la visualización del tuberculo genital en una localizacion u otra Su imagen es la de una estructura hiperecogénica que puede aparecer bilobulada o trilobulada Esta estructura originará el pene en el macho y el clitoris y la vulva en la hembra (Ruperez 1997 y Quintela et al 2006)

Para el dia 80 ya no se habla de tubérculo genital sino de pene y clitoris Además se visualizan ya escroto y mamas (Bo y Caccia 2000 Tamayo 2000

Bellenda 2003 Ruperez 1997 y Quintela et al 2006) Hasta el día 50 el tubérculo genital se encuentra en una distancia intermedia entre el cordón umbilical y la base de la cola en este momento se aproxima hacia el cordón umbilical en el macho o hacia la base de la cola en la hembra (Ruperez 1997 y Quintela et al 2006) La ubicación definitiva detrás del cordón umbilical en el macho se produce en el día 56 y cerca de la base de la cola en la hembra el día 53 (Bo y Caccia 2000 y Tamayo 2000)

Por ecografía se diagnostica el sexo a partir del día 55 de gestación La edad ideal va desde el día 58 al 75 esto depende en gran medida de la localización del útero así si el útero se mantiene pélvico el sexado se puede realizar hasta más de los 100 días pero si la vaca tiene un útero grande o descolgado en cavidad abdominal es muy difícil llegar con la sonda cerca del feto y obtener una calidad de imagen diagnóstica (Ruperez 2004 De la Riera 2004 Gnemmi 2004)

## **2.4 Estudio de la Dinámica Folicular**

Como se vio en más detalle en la parte B de la revisión de literatura otra de las aplicaciones de la ultrasonografía es el estudio de la dinámica folicular Gracias al empleo de la ecografía en vacuno se han conseguido establecer los patrones de crecimiento folicular en hembras prepúberes con 2 semanas de edad (Evans et al 1994) en novillas (Savio et al 1988 Ginther et al 1989b Sunderland et al 1994 Solis 2006) en vacas postparto (Savio et al 1990) en gestantes (Pierson y Ginther 1986 Ginther et al 1989c Thatcher et al 1991 Ginther et al 1996b)

en vacas anovulatorias (McDougall et al 1995) o en vacas que habian recibido tratamientos de sincronizacion de celos (Sirois y Fortune 1990 Stock y Fortune 1993)

El uso de la ultrasonografia ha permitido revelar que el crecimiento folicular ocurre en forma de ondas de modo que fundamentado en este acontecimiento se ha podido mejorar la eficiencia en programas de reproducción asistida como la sincronización de la ovulación (Bo 2002) la superovulación (Bo y Mapletoft 1999 Solís 2006) y la aspiracion folicular transvaginal (Adams et al 1993 Seneda et al 2001)

## **2 5 Aspiracion Folicular Transvaginal para Obtencion de Ovocitos**

Durante los años 90 la ecografia guiada comenzó a utilizarse como metodo de recoleccion de ovocitos en bovinos los que luego son empleados para la produccion in vitro de embriones Se realiza tanto en vacas adultas como en animales juvenes

Para la realización de esta técnica el transductor o sonda es colocado en un soporte rigido de 50 centímetros que contiene la guía de la aguja de punción Las agujas se introducen por una guia adaptada a la parte plástica o metálica que sujeta el transductor una bomba de vacío permite realizar la presión de aspiración necesaria para recolectar el contenido de los foliculos puncionados (Denis 2008) Este procedimiento aporta considerables ventajas al ser poco

traumático mínimamente invasivo y ser repetible en sucesivas ocasiones (Quintela et al 2006)

La imagen de la pantalla del ecógrafo se utiliza para guiar la aguja de punción dentro del ovario hasta el folículo por lo que la calidad de la imagen del equipo es de suma importancia (Bo y Caccia 2000)

En la actualidad se trata de una técnica plenamente consolidada ya que la combinación de la aspiración folicular transvaginal ecoguiada y de la fecundación in vitro ha permitido la obtención de un gran número de terneros. Además la combinación de ambas técnicas permite producir mayor número de embriones por unidad de tiempo que los programas MOET (Quintela et al 2006)

## **2.6 Diagnóstico de Patologías del Aparato Reproductor**

A menudo se encuentran en el aparato reproductor patologías que son de difícil identificación por palpación rectal además de que en muchas ocasiones no se puede distinguir unas de otras como lo es el caso de los quistes ováricos que pueden ser luteales o foliculares. Además de estas algunas otras patologías del aparato reproductor que pueden ser detectadas por ultrasonografía son la endometritis, metritis, piometra y fetos macerados y momificados.

El diagnóstico de quistes en el ganado vacuno ocurre con mayor frecuencia durante los exámenes posparto de rutina (Tamayo 2000, Fricke 2004). La palpación rectal de una estructura grande y llena de fluido es comúnmente interpretado como un hallazgo clínico de un quiste folicular. La diferenciación de

quiste folicular quiste folicular luteinizado y cuerpo luteo con cavidad por palpación rectal no es fácil (Pieterse 1989 Tamayo 2000 Fricke 2004) La precisión en el diagnóstico aumenta cuando se usa ultrasonografía transrectal con la correcta identificación de más del 90 por ciento de los quistes luteales y cerca del 75 por ciento de los foliculares (Tamayo 2000 Fricke 2004) Hay que tener en cuenta que una sola exploración ecográfica a menudo no será suficiente y habrá que tratar el perfil ultrasonográfico a lo largo de varios días (Pérez et al 2002)

En el aparato reproductor también son frecuentes las colecciones de líquidos (mucus) y sobre todo patológicos (endometritis metritis y piometra) Estas colecciones líquidas al contrario de lo que ocurre con las vesículas embrionarias no están contenidas en una membrana El contorno es de hecho irregular (Chaffaux et al 1982) Sin embargo el exudado purulento en el útero es altamente ecogénico y podría pasar desapercibido pero se diferencia por que se mueve libremente (Brad 1994)

En los casos de fetos macerados y momificados se aprecia un acumulo de huesos cuya distribución se puede evaluar adecuadamente con el ecógrafo Los fragmentos de huesos se ven como áreas densas ecogénicas Rodeando y entre los huesos se ve fluido purulento con la típica apariencia de un fondo no ecogénico conteniendo numerosas y pequeñas partículas ecogénicas (Fissore et al 1986)

## **D ASPIRACION FOLICULAR TRANSVAGINAL GUIADA POR ECOGRAFIA EN EL BOVINO (OVUM PICK UP OPU)**

La tecnica de aspiración folicular transvaginal guiada por ecografia conocida como OPU por sus siglas en ingles (Ovum Pick up) consiste en la recolección de ovocitos (con ayuda de una aguja introducida por la vaginal) mediante la punción de los folículos visualizados a través de un ecógrafo en hembras vivas (Pieterse et al 1988 Denis et al 2000 Bage et al 2003)

La misma comenzó a utilizarse en la mujer en la década de los años 80 y se describe por primera vez en bovinos por Pieterse et al (1988) a finales de los años 1990 La técnica se habia extendido vertiginosamente a numerosos paises ya que sin dudas abre nuevos horizontes en el campo de las biotecnologias de la reproduccion Actualmente se utiliza por la mayoría de los centros dedicados a la producción de embriones in vitro (Hasler et al 1995 Ward et al 2000 Petyim et al 2003)

Antiguamente la recolección de ovocitos para la produccion in vitro de embriones provenia sólo de hembras sacrificadas u ovariectomizadas Esta metodologia presenta grandes limitaciones puesto que no permite ser reproducida disminuyendo la producción de embriones y por tanto se encuentra limitada la posibilidad de descendencia de las hembras sacrificadas En cambio la técnica de OPU permite la obtencion de ovocitos de calidad y de forma estable a partir de animales previamente seleccionados y controlados Este

procedimiento no invasivo y repetible no afecta el estado productivo y/o reproductivo ni compromete la fertilidad futura de las donantes (Donnay et al 1997 Maillard et al 2003 Denis 2008)

La producción in vitro de embriones (PIV) a partir de ovocitos recolectados por OPU puede ser una alternativa para la transferencia de embriones (TE) tanto en un marco comercial como en los programas del mejoramiento genético (Roschlau et al 2003) Con la utilización de esta técnica se pueden producir dos ó tres veces más embriones por vaca que por el método convencional (Palma 2001)

## **1 Aplicaciones de la Técnica**

La aspiración folicular in vivo fue empleada para sincronizar la onda de crecimiento folicular este método tuvo su origen a partir de la cauterización del folículo dominante (Adams et al 1993) Se recomienda la aspiración de todos los folículos mayores de 5 mm lo cual se logra a partir de la ultrasonografía via transvaginal observándose el crecimiento sincrónico de una nueva onda folicular 15 días post aspiración (Denis 2000) Trabajos realizados con vacas Criollas (Denis 2001) y Siboney (Denis 2006) han evidenciado el inicio de una nueva onda de crecimiento folicular 17 días después de aplicada la aspiración folicular con características similares a la onda normal

Estos trabajos de sincronización de la onda folicular a través de OPU sirvieron de base para evaluar la respuesta superovulatoria entre este método (físico) y

los tratamientos clásicos hormonales (Bo et al 2000 Mapletoft et al 2003 Burke et al 2003 Martinez et al 2003) Todos estos estudios son de gran utilidad para la elaboración de nuevas estrategias para la aplicación de métodos de sincronización de celos inducir la ovulación tratamientos superovulatorios e incremento de la fertilidad (Pedroso y Roller 1999 Roller 2006) así como para incrementar significativamente la respuesta superovulatoria cuando se hace coincidir el inicio del tratamiento con el inicio del crecimiento de una nueva onda folicular (De Roover et al 2005)

Además de la sincronización de las ondas foliculares la técnica OPU es muy utilizada en todo el mundo para la obtención de ovocitos utilizados para la producción in vitro de embriones (Goodhand et al 2000 Merton 2003 Aller et al 2010) Antiguamente la recolección de ovocitos para este fin provenía solo de hembras sacrificadas u ovariectomizadas Esta metodología presenta grandes limitaciones comparada con la OPU puesto que no permite ser repetido disminuyendo así la producción de embriones y descendencia de las hembras sacrificadas (Palma 2001)

La OPU como fuente estable para la obtención de ovocitos puede ser utilizada en aquellos animales que presenten problemas reproductivos (oviductos obstruidos metritis persistente etc) animales viejos refractarios a los tratamientos superovulatorios así como de animales saludables de alto valor genético que se encuentren vacías gestantes (primer trimestre) o en el periodo pospartal temprano (60 días) (Denis 2008)



Pueden obtenerse además ovocitos de hembras prepúberes a partir de un mes de nacidas lo cual disminuye considerablemente el intervalo generacional (Murphy y Pescador 1996) En resumen la técnica (OPU) demuestra ser un procedimiento efectivo para obtener ovocitos a partir de animales vivos resulta ser un procedimiento no invasivo y repetible que permite incrementar el rendimiento reproductivo de hembras superiores genéticamente al utilizar los ovocitos obtenidos para la producción de embriones a partir de otras biotecnologías como la fertilización in vitro Permite además incrementar la descendencia de hembras subfértiles así como de animales prepúberes y gestantes todo lo cual posibilita una mayor precisión de los índices de selección y realización de investigaciones básicas en hembras donantes (Douar 1998)

Existen reportes de otros métodos empleados para la recolección de ovocitos en hembras vivas de forma repetida tal es el caso de la punción folicular utilizando para ello la técnica laparoscópica (Schellander 1989) pero este resulta demasiado invasivo y laborioso siendo frecuentes las formaciones de adherencias y existe un alto riesgo de peritonitis Finalmente desde que Pieterse et al (1988) modificaron la técnica de aspiración folicular utilizada en reproducción humana para utilizarla en la ganadería este método se ha impuesto y ha sido modificado hasta la actualidad por diferentes grupos de investigadores (Aerts et al 2004 Bols 2005)

## 2 Descripción de la Técnica

Para la realización de esta técnica el transductor o sonda es colocado en un soporte rígido de 50 centímetros que contiene la guía de la aguja de punción. Las agujas se introducen por una guía adaptada a la parte plástica o metálica que sujeta el transductor. Una bomba de vacío permite realizar la presión de aspiración necesaria para recolectar el contenido de los folículos punccionados. Presiones entre 50 (Fry et al 1994) y 85 milímetros de mercurio (Gibbons et al 1994) han sido reportadas con buenos resultados.

Existen tres tipos de agujas: las largas de uso único, las cortas de inyección (desechables) y un sistema semidesechable en el cual se cambia la punta de las agujas largas por agujas cortas desechables. Las largas (35 a 60 centímetros) tienen el inconveniente que pierden el filo con facilidad, por lo que es necesario cambiarlas entre vaca y vaca, son muy caras y el ovocito debe transitar una gran distancia por una superficie metálica. Las cortas son también de uso único y mucho más baratas, constituyendo un sistema más práctico (Denis 2008).

Las agujas de bisel corto suelen ser más eficaces, ya que la tasa de recolección es mayor y el daño a las células del cumulo menor (Bols et al 1997). En el caso del sistema semidesechable se han reportado daños en la calidad de los ovocitos recolectados debido a la toxicidad de los fundentes utilizados y longitud metálica por donde debe transitar el ovocito (Bols 2005).

Para la realización de OPU (Bols et al 2004) resulta indispensable disponer de tres componentes un equipo de ultrasonido (ecógrafo) con su respectivo transductor una bomba de aspiración y un sistema de guía de aguja conectado a un tubo colector

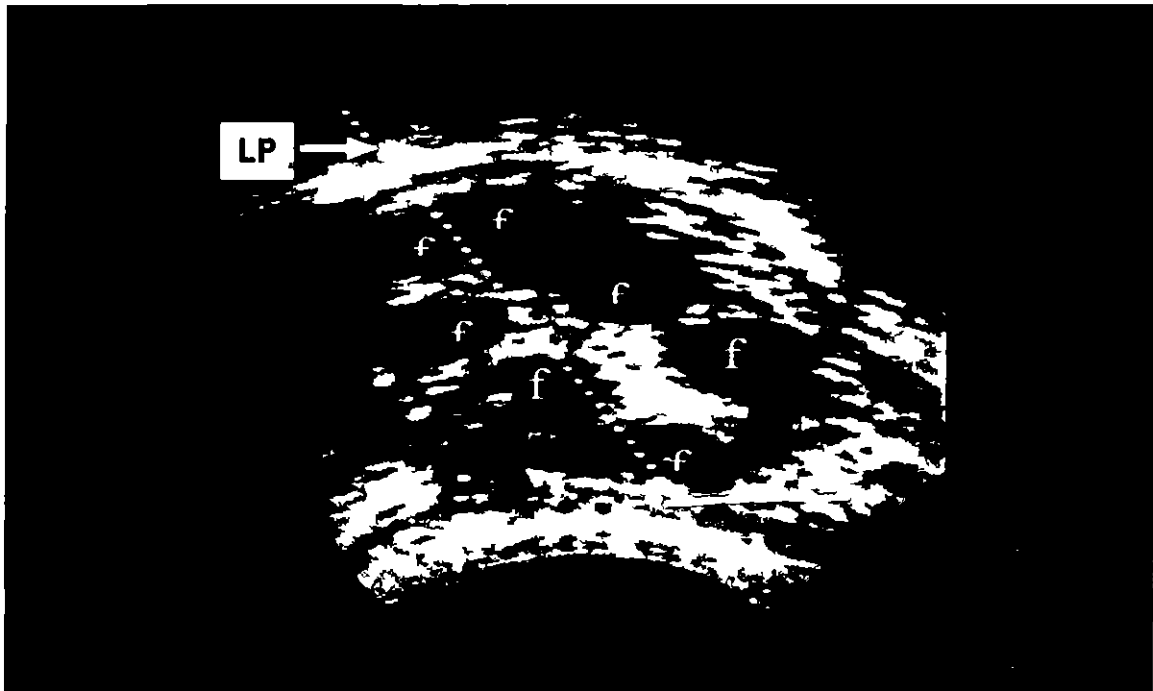
En la actualidad existe una gran variedad de marcas de ecógrafos (Aloka Pie Medical Starvet Essaote Aquila etc) muchos de los cuales se han especializado en el diseño de transductores (sectoriales convexos o lineales) apropiados para realizar OPU capaces de trabajar incluso con dos frecuencias (Denis et al 2004) Justo antes de iniciar el acto de la punción algunos equipos de trabajo prefieren sedar las hembras con hidrocloreto de detomidina (Domocedan) via endovenosa a razón de un miligramo por 100 kilogramos de peso vivo y/o (Buscopan) hyoscine N butylbromide utilizado como relajante intestinal antes de aplicar la anestesia epidural (Bols 1997) Sin embargo en Francia y otros países OPU se realiza de modo habitual solo con la aplicación de anestesia epidural (5 mililitros de lidocaina al dos por ciento) de modo que se produzca la insensibilización del aparato genital y una disminución de los movimientos peristálticos a nivel del recto lo cual facilita tanto la localización como la manipulación de los ovarios (Heyman et al 2002)

Posteriormente se extraen las heces fecales del recto y se procede a la limpieza desinfección y secado de la vulva y la región perineal con agua desinfectante y papel higiénico Una vez colocada la aguja en la guía del transductor se introduce este a través de la vagina la mano libre del operador se introduce por

el recto para proceder a la localización y acercamiento del ovario al transductor que se coloca a la derecha o izquierda del cervix según el ovario seleccionado para iniciar la punción (Bols 1997)

Los folículos se observan como imágenes anecogénicas (color negro) en el ovario es necesario hacer coincidir estos con la línea discontinua que aparece en la pantalla del ecógrafo (previa activación del menú punción) y que marca el recorrido de la aguja (Figura No 4)

**FIGURA No 4 IMAGEN ECOGRÁFICA DE UN OVARIO CON LOS FOLÍCULOS (F) Y LÍNEA DE PUNCIÓN (LP) QUE MARCA EL RECORRIDO DE LA AGUJA**



Esto se logra a través de la manipulación sobre el ovario posteriormente se inicia la presión negativa y se hace avanzar la aguja es posible visualizar la

aspiración al desaparecer de la pantalla la imagen del folículo (Bols 1997) La manipulación de la aguja puede realizarse por el propio operador aunque por lo engorroso que resulta generalmente es realizado por un ayudante Antes de iniciar la operación se hace pasar por la aguja una solución fosfatada buferada (PBS) a la cual se le adiciona 0.4 por ciento de suero de albumina bovino (SAB) o uno por ciento de suero fetal bovino (SFB) y 10 unidades internacionales por mililitro de heparina sódica para evitar la coagulación de la sangre que es abundante en el tubo de recolección (Hasler 1992) también es posible pasar solamente la solución de PBS con heparina (Heyman et al 2002)

El contenido de la punción cae directamente a un filtro o a un tubo de recolección el cual se mantiene a 37 grados centígrados hasta el momento en que se procede a la búsqueda y clasificación de los ovocitos colectados El diámetro del filtro utilizado no debe ser mayor de 100 micras (Filtro EMCON) posteriormente el contenido se lava con PBS o puede adicionársele a esta 0.4 por ciento de SAB y 10 unidades internacionales por mililitro de heparina sódica (a 37 grados centígrados) para eliminar la sangre (Nibart y Marquant Le 1995) y realizar más fácilmente la búsqueda y clasificación morfológica de los ovocitos la cual se realiza en un estereoscopio óptico binocular (Marquant Le et al 1989)

## **2.1 Clasificación de Ovocitos**

La morfología de las células del cumulo y el aspecto microscópico del citoplasma son los aspectos considerados de mayor importancia para estimar la calidad de

los ovocitos colectados ya que se ha demostrado la relación que existe entre estos y el posterior desarrollo embrionario (De Loss et al 1989 Hazeleger et al 1995) Otros estudios (Fair et al 1995) relacionan además la talla del ovocito con el desarrollo embrionario posterior y encontraron que ovocitos con un diametro inferior a 110 micras tienen una maduración nuclear y/o citoplasmática incompleta en el momento de la fecundación y el número de blastocistos que se logra con ellos es significativamente inferior al que se alcanza con ovocitos de mayor tamaño (mayor a 110 micras)

#### CUADRO I CRITERIOS DE SELECCIÓN DE LOS COMPLEJOS CUMULUS OVOCITOS

Clasificación	Criterios
1	Cumulus con capas múltiples Cumulos compacto La totalidad el CCO es clara y transparente Citoplasma homogéneo
2	Cumulus como 1 o algo más oscuro y menos transparente Ooplasma con granulación más gruesa y más oscura que en 1 en la periferia
3	Cumulus menos compacto más oscuro que en 1 o 2 Con manchas oscuras
4	Cumulus expandido

Fuente De Loos et al (1989)

### 3 Factores que Inciden en los Resultados de la Técnica

Esta técnica se utiliza en donantes que se encuentren en diferentes estados productivos (secas o en ordeno) y/o reproductivos (novillas o vacas gestantes)

En este caso se recomienda realizar la punción entre el segundo y tercer mes

de gestación ya que en el primer mes resulta riesgoso lisar el cuerpo luteo joven y comprometer la anidación del embrión. Pasados los tres meses de gestación los ovarios son inaccesibles por esta vía. OPU ha sido aplicada además con buenos resultados en animales tanto fértiles como infértiles. Existe un grupo de factores técnicos y biológicos que influyen en los resultados de la punción folicular in vivo (Douar 1998) dentro de estos se encuentran

### **3.1 Factores Técnicos que Influyen en los Resultados**

Estos son factores vinculados al equipo de aspiración empleado los cuales se considera pueden ejercer gran influencia sobre la cantidad y calidad de los ovocitos colectados. Tal es el caso de las agujas para la aspiración y la presión de vacío empleadas.

#### **3.1.1 Tipo y Calidad de las Agujas Utilizadas**

Dentro de los aspectos relacionados la calidad de las agujas y el filo que estas posean (Sasamoto et al 2003) resultan esenciales para el éxito de OPU (Scott et al 1994).

Un gran número de investigadores recomiendan el empleo de agujas largas (50-60 centímetros) con diámetro exterior entre uno y 1.5 milímetros. Estas son relativamente fáciles de construir y manejar y tienen una vida útil prolongada (Pieterse et al 1988, Galli et al 2001, Merton 2003). Entre sus desventajas figuran sus altos precios y la pérdida con facilidad del filo por lo que necesitan ser reafiladas regularmente. Sin embargo no vuelven a recuperar su filo inicial.

(Simon et al 1993) Rath (1993) desarrollo un método alternativo al utilizar agujas desechables (utilizadas en la vía epidural número 18G) las cuales poseían entre sus ventajas que resultan muy baratas estériles y adaptables Sin embargo se requería de un complejo sistema de guía para poder ser utilizadas el próximo paso fue simplificar este sistema Bols et al (1998) diseñaron un sistema que combinó estas agujas desechables y su sistema de guía a un dispositivo metálico que fijaba además un transductor sectorial todo lo cual facilitaba la operación y obtuvieron un 42 por ciento de tasa de recolección (número de ovocitos recolectados por cada 100 folículos puncionados) Este valor es influenciado por el diámetro de la aguja la presión de aspiración y la experiencia del operador reportándose resultados por diferentes equipos de trabajo que varían entre siete por ciento (Scott et al 1994) y 69.6 por ciento en la tasa de recolección (Looney et al 1994)

### **3.1.2 Presión de Aspiración**

La presión de aspiración que se alcanza en la punta de la aguja depende tanto de la presión negativa ejercida por la bomba de aspiración como del largo y ancho del sistema de tubos de recolección y del diámetro de la aguja utilizada por lo que resulta más aceptado expresar esta como la cantidad de fluido recolectado por minuto que en milímetros de mercurio ya que un simple cambio en el diámetro de la aguja puede triplicar la cantidad de fluido recolectado (Bols et al 1996) Este aspecto tiene gran importancia ya que existe una relación directa entre la presión de aspiración y la calidad de células del cumulo intactas



de estos dependerán los resultados que se obtengan en cuanto a maduración y capacidad futura de desarrollo embrionario

Bols et al (1996) compararon tres diámetros de aguja y cinco presiones de aspiración y obtuvieron las mayores tasas de recolección con las agujas de mayor diámetro (18G) independientemente de la presión de aspiración utilizada mientras para todos tipos de agujas las mayores tasas de recolección fueron logradas al aplicar las mayores presiones de aspiración Sin embargo las mayores cantidades de ovocitos con cumulos intactos se obtuvieron al aplicar presiones de aspiración menores o sea que el número de complejos cumulo ovocitos (COCs) intactos decreció en la misma medida en que la presión de aspiración era mayor aumentando también el número de ovocitos desnudos similares resultados fueron confirmados más tarde por Ward et al (2000)

En cuanto al diámetro de la aguja Bols et al (1996) encontraron una mayor cantidad de ovocitos con cumulos intactos y menor cantidad de ovocitos desnudos al utilizar agujas número 21 (21G) a bajas presiones Galli et al (2001) y Petyim et al (2001) alcanzaron buenos resultados utilizando presiones entre 20-25 mililitros de agua por minuto y 12-15 mililitros de agua por minuto empleando agujas con diámetro de 20G y 19G respectivamente mientras Argov et al (2004) recomienda una presión de aspiración de 25 mililitros de agua por minuto al utilizar agujas con un diámetro de 18G

Denis (2006) después de probar tres presiones de aspiración demostró que una presión de aspiración de 26 mililitros de agua por minuto resulta óptima tanto

para la tasa de recolección como para la cantidad y calidad de los ovocitos recolectados presiones inferiores y superiores a esta (18 y 36 mililitros de agua por minuto) producen variaciones desfavorables en estos indicadores

### **3 2 Factores Biologicos que Influyen en los Resultados**

En este grupo se encuentran aquellos factores relacionados directamente con la fisiología del animal. Tal es el caso de la frecuencia de aspiración y la estimulación hormonal previa que tienen un efecto sobre la dinámica folicular y por ende sobre cantidad de estructuras foliculares disponibles para la aspiración. La condición corporal, estado de salud, raza, edad, fertilidad y categoría de la donante también pueden influenciar los resultados.

#### **3 2 1 Frecuencia de la Punción Folicular y el Momento Relativo al Ciclo de la Donante**

Una de las ventajas que ofrece esta técnica es precisamente que puede ser altamente repetible en un mismo animal. Al respecto Pieterse et al (1991) realizó OPU en diferentes momentos del ciclo estral durante un periodo superior a tres meses. Vos et al (1994) obtuvieron un número significativamente superior de ovocitos cuando realizaron la OPU 22 horas posterior al pico de LH respecto a cuando realizaron esta antes de que se produjera el pico de esta hormona.

Por su parte Hendriksen (2004) obtuvo un número de complejos cumulo ovocitos (COCs) de mayor calidad cuando realizó OPU el día cinco del ciclo.

estral respecto a cuando realizo esta el día ocho momento en que estuvo presente un folículo dominante lo que sugiere que la presencia de este folículo afecta o inhibe el desarrollo del resto de los folículos subordinados Van der Schans et al (1991) puncionaron un mayor número de folículos (46 0 contra 25 3) y obtuvieron un mayor número de COCs (18 8 contra 10 8) en vacas estimuladas hormonalmente cuando los ovarios fueron puncionados dos veces por semana comparada con una punción

Varios autores coinciden en afirmar que la frecuencia de aspiración de dos veces por semanal ofrece los mejores resultados en cuanto a cantidad y calidad de COCs recolectados (Simon et al 1993) y número de blastocitos obtenidos después de la fertilización in vitro (Gibbons et al 1994) Por lo que se puede asumir que con esta frecuencia de OPU el folículo dominante es aspirado durante cada sesión y de este modo se estimula el crecimiento de una nueva onda folicular formada solamente por pequeños folículos en crecimiento (Bergfelt et al 1994) Sin embargo existen reportes que refieren haber obtenido óptimos resultados con la aplicación de esta técnica tras un intervalo de siete días entre sesión de OPU (Imai et al 2000)

### **3 2 2 Condición Fisiológica y Corporal de las Donantes**

La recolección de ovocitos en animales vivos no excluye a las hembras en estado de gestación de modo que es posible realizar la recolección durante el primer trimestre de la gestación (Reinders et al 1996) Esta puede realizarse además en hembras después de haber sido estimuladas con FSH (Meintjes et

al 1995) aunque no siempre se logra obtener mayor número de ovocitos (Bungartz et al 1995) Domínguez (1995) encontró incremento en el número de folículos medianos y grandes en hembras gestantes comparado con hembras cíclicas Argov et al (2004) observaron un incremento de folículos recolectados al aumentar el número de sesiones de aspiración en vacas al inicio de la lactancia La subnutrición (condición corporal desfavorable) no tuvo un efecto negativo en la morfología de los ovocitos

No obstante se evidenció una disminución significativa en el número de blastocistos producidos *in vitro* (Lopez et al 1996) y el incremento proporcional encontrado por Domínguez (1995) entre la calidad de los ovocitos en la medida en que se incrementaba la condición corporal Leroy (2004) demostraron por su parte que los cambios metabólicos detectados en el suero de vacas altas productoras de leche después del parto están presentes también en el líquido folicular de los folículos dominantes por lo que las posibilidades de desarrollo del ovocito presente en el pueden verse limitadas

### **3 2 3 Raza Edad Fertilidad y Categoría de la Donante**

Gran cantidad de estudios demuestran mayor respuesta en ganado *Bos indicus* debido a que los animales *Bos indicus* presentan naturalmente mayor número de folículos por onda ovocitos (Blaschi et al 2004) como indica Cruz et al (2009) cuando encontraron un promedio de 16.3 COCs proveniente de vacas *Bos indicus* versus 4.6 ovocitos procedentes de vacas *Bos taurus* De Armas et al (1994) recolectaron una mayor cantidad de complejos cumulo-ovocitos por

ovario en la raza Holstein respecto a los cruzamientos (Holstein x Cebu) Sin embargo la cantidad de blastocistos obtenidos despues de la FIV fue superior en los animales mestizos Katska y Smorag (1984) observaron una disminucion progresiva en la actividad ovarica en vacas viejas pero no decrecio con la edad la capacidad de produccion de gametos

La utilización de OPU en animales muy jóvenes está limitada por el reducido tamaño de la pelvis pero en dependencia del desarrollo del tracto genital y del tipo de transductor utilizado se han reportado trabajos en novillas entre 6 y 8 meses en la raza Holstein Friesian (Bols et al 1999) También se ha reportado la aplicación de esta técnica en terneras pero varía la forma de manipulación de los ovarios (Brogliatti et al 1995) aunque el principal problema que se presenta después de aplicar OPU en animales impuberes esta relacionado con la disminución en la capacidad de desarrollo in vitro de los ovocitos recolectados (Taneja 2000) Van Wagtendonk et al (1998) encontraron un numero significativamente mayor de blastocistos cuando utilizaron donantes de ovocitos mayores de tres años respecto a las menores (46.7 contra 42.0 por ciento respectivamente)

~

Nibart y Marquant Le et al (1995) muestran resultados de varios autores relacionados con la cantidad y calidad de ovocitos colectados la tasa de colección y el promedio de embriones viables obtenidos al utilizar vacas o novillas como donante donde los mejores resultados en todos los indicadores evaluados están a favor de las primeras Denis et al (2006) demostró que la

categoría de la donante influye significativamente ( $P < 0.01$ ) en los resultados de la técnica de OPU siendo estos superiores en vacas respecto a las novillas independientemente de su estado reproductivo (gestantes y vacías)

OPU tiene entre sus ventajas que puede ser empleada en aquellos animales que no tengan buena respuesta a los tratamientos superovulatorios. En Bélgica el primer ternero nacido por esta técnica se logró a partir de un ovocito recolectado de una vaca de baja fertilidad seguido de la transferencia de otros 56 embriones producidos *in vitro* donde de las 12 gestaciones logradas siete correspondían a donantes de alto valor genético (Bols et al 1996)

Otro de los factores que influye significativamente los resultados de OPU es de la individualidad de la donante de modo que se han reportado diferencias entre estas que van desde cero a 26 ovocitos recolectados por donante (Hasler et al 1995). Otros trabajos han comparado la cantidad de ovocitos colectados (3.1 contra 6.1) y la cantidad de blastocistos obtenidos por sesión (0.5 y 1.5 respectivamente) al utilizar novillas de la raza Holstein Friesian de baja fertilidad comparada con novillas saludables de la misma raza (Bols et al 1996)

### **3.2.4 Estimulación Hormonal previa a OPU**

Existen numerosos reportes relacionados con la recolección de ovocitos sin necesidad de utilizar algún tipo de estimulación hormonal (Pieterse et al 1991) ya que en todos los casos han sido observados folículos con un diámetro superior a dos milímetros (Kruip et al 1994). Sin embargo se han encontrado

en algunos animales con baja actividad ovárica (Bousquet et al 2000) en los cuales se hace necesario utilizar una combinacion de FSH LH o de gonadotropina gonadotropina crónica equina (eCG) las cuales se conoce tienen un efecto positivo en los tratamientos superovulatorios utilizados en la transferencia de embriones aunque se realizan modificaciones en las dosis y el tiempo del tratamiento

Pieterse et al (1988) reportaron tasas de recolección superiores después de tratar a las donantes con eCG unido a un aumento en el tamaño de los ovarios y la cantidad de folículos. Trabajos posteriores (Pieterse et al 1992) mostraron un mayor número de folículos punccionados por sesión en vacas estimuladas hormonalmente sin embargo las tasas de recolección fueron inferiores. Chong et al (2008) reportaron un incremento significativo en el número de folículos punccionados y ovocitos recolectados al estimular las donantes con eCG

Se han reportado tratamientos progestativos (Nibart et al 1995) o con FSH utilizando el mismo esquema de los tratamientos superovulatorios empleados en la transferencia de embriones (Paul et al 1995). La utilización de dichos tratamientos condiciona la frecuencia de la recolección ya que las hembras superovuladas solo pueden ser punccionadas una vez cada tres o cuatro semanas mientras que las no superovuladas pueden ser punccionadas una o dos veces por semana.

Otros autores (Goodhand et al 2000 De Ruigh et al 2000) reportan un incremento tanto en la cantidad de folículos punccionados como en la cantidad de

ovocitos recolectados después de estimular la donante con FSH Stubbins y Walton (1995) por su parte no encontraron diferencias significativas en el numero de folículos colectados por puncion en hembras no estimuladas puncionadas dos veces por semana respecto a vacas estimuladas con FSH puncionadas una vez por semana De Roover et al (2005) reportaron que cambios mínimos en las dosis de FSH influyen en el tamaño pero no en el numero de folículos el cual si se vio influenciado por la donante y el numero de sesiones de OPU

También se ha estudiado el efecto de la hormona somatotropica bovina (BTS) en la población folicular (Bols et al 1998) encontrandose un incremento significativo en el numero total de folículos puncionados en hembras tratadas con dicha hormona respecto a las no tratadas pero en cuanto al numero de ovocitos recolectados no se encontraron diferencias significativas Murakami et al (2003) demostraron que la utilización conjunta de FSH con BTS podia provocar un numero mayor de folículos que deben puncionase y de ovocitos recolectados de optima calidad

Goodhand et al (1999) por su parte llegaron a la conclusión que la cantidad de embriones transferibles producidos después de una sesion de OPU semanal en hembras estimuladas con FSH resulta similar al alcanzado despues de aplicar dos sesiones de punción semanal en hembras no estimuladas Recientemente Bols et al (2004) han propuesto la inyección intraovarica de minidosis de FSH



LH para incrementar la población folicular sin que el costo del tratamiento se incremente significativamente

#### **4 Salud de las Donantes de Ovocitos**

Con el advenimiento de la técnica de producción de embriones in vitro (PEIV) se hizo posible una alta utilización de genética animal seleccionada. Esta biotecnología ha demostrado ser capaz de proporcionar un gran número de descendientes. La evaluación periódica de los animales sometidos a aspiración folicular podría ayudar a controlar la aparición y gravedad de las lesiones. Los resultados de Viana et al (2002) demostraron que las perforaciones del fondo de saco vaginal fueron curados con prontitud y en sólo dos ocasiones se observaron irritaciones transitorias de la vagina y el cuello del útero. En general no hay alteraciones inflamatorias o procesos infecciosos en la vagina o en el resto del trato genital tubular (Viana et al 2003b).

Los puntos de perforación del fondo de saco vaginal pueden ser identificados hasta 48 a 72 horas después de los pinchazos (Viana et al 2003b). La formación de hematomas en la región perivaginal también pueden encontrarse (Sauvé 1998) pero esta condición no parece causar grandes problemas para la donante. Las perforaciones de los ovarios pueden causar la aparición de secuelas como fibrosis y adherencia sobre todo en vacas sometidas a muchas sesiones de la punción. Los cambios histológicos tales como la mineralización del parénquima o folicular dentro de las estructuras se encontraron con

independencia del numero de sesiones de la puncion folicular (Demarque et al 2003)

En los ovarios que presentaron el mayor numero de punciones el engrosamiento del epitelio ovárico comprometió la vision de folículos externos cuando los ovarios se evaluaron macroscopicamente (Viana et al 2003b) Gibbons et al (1994) encontraron que los animales sometidos a un máximo de 20 sesiones de punción mostraron una baja incidencia de lesiones Viana et al (2002) no observaron ninguna reduccion en la recuperacion de ovocitos por vaca en el curso de su periodo de prueba incluso cuando se encontraron secuelas de tratamiento

Es importante tener en cuenta que la aspiracion folicular es una tecnica que tiene pros y contras El riesgo de secuelas existe y debe ser considerado La realizacion del procedimiento debe hacerse con el fin de minimizar los daños posibles a fin de que los resultados superen las desventajas que se esperadas (Seneda et al 2009)

## **5 Producción de Embriones por Fecundacion In Vitro a partir de Donantes Vivas versus Programas Convencionales de Transferencia de Embriones por Superovulacion (MOET)**

De acuerdo con el Manual Merck de Veterinária (2001) el periodo normal de gestacion bovina varia entre 281 a 89 dias es decir cerca de nueve meses Esto posibilita a la vaca a concebir apenas una cria al ano La aspiración

folicular presenta un potencial de producción de embriones y de gestaciones con resultados mejores que los obtenidos con otras técnicas pudiendo ser empleada en hembras con condiciones reproductivas normales o en hembras pre puberes Ball et al (2006) observaron en sus investigaciones que una vaca de ocho años de edad produce 176 embriones durante 158 colectas semanales

Dode et al (2002) afirman que la aspiración de ovocitos inmaduros por aspiración folicular transvaginal asociada a la fecundación in vitro posibilita que sean producidas 36 crías por año de una única donadora De acuerdo con Pieterse et al (1988) el objetivo final de la aspiración folicular transvaginal es la producción de más embriones y más gestaciones por vaca donante que por medio de la superovulación con los programas convencionales de transferencia de embriones (MOET) Posteriormente Bols et al (2005b) afirman que en la técnica de MOET las vacas pueden ser lavadas de tres a cuatro veces durante el año con un promedio de cinco embriones por lavado Con la técnica de aspiración folicular transvaginal guiada por ultrasonografía una vaca puede ser sometida a dos sesiones semanales obteniéndose dos embriones por donadora por semana siendo cuatro a cinco veces mayores los valores encontrados en esta

Viana et al (2001) afirman que la técnica de OPU presenta grandes ventajas cuando es comparada con los métodos convencionales de reproducción asistida ya que posibilita la recuperación de gametos directamente del ovario independientemente de la época del ciclo estral y sin la necesidad de

superovulacion Tambien es posible la obtencion de productos a partir de animales con infertilidad adquirida por disturbios en la porcion tubular del tracto genital

Segun de Armas (2007) en la superovulacion el principal problema es la gran variabilidad individual en la respuesta de cada animal ya que de todas las donantes que se someten a la sobre-estimulacion ovárica entre un 15 y un 20 por ciento no producen embriones trasferibles

Para Seneda et al (2002) MOET presenta algunas otras restricciones ya que hay un gran numero de donadoras que presentan ovarios quisticos endometritis y lesiones iatrogenicas De modo que el numero de estructuras recuperadas no siempre justifica la utilización de esta tecnica Otros factores de la técnica de MOET que pueden comprometer a las donadoras son la constante interrupcion del ciclo estral y las terapias gonadotróficas Una restriccion que tambien puede inviabilizar la MOET es la imposibilidad de realizar esta tecnica en algunas situaciones de infertilidad extra ovarica como obstrucciones uterinas

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

Este estudio fue realizado en el Centro de Investigación en Biotecnología Agropecuaria, de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad de Panamá. Ubicado en el corregimiento de Chiriquí, localizado a los 8°23'15.12" de latitud norte y 82°19'47.48" de longitud oeste, con una elevación de 26 msnm. Dicho centro se encuentra ubicado dentro de la zona climática tropical de sabana, con una temperatura máxima de 32.0 °C y mínima de 22.1 °C, una precipitación pluvial anual con promedio de 2 856.9 mm y una humedad relativa de 80%.

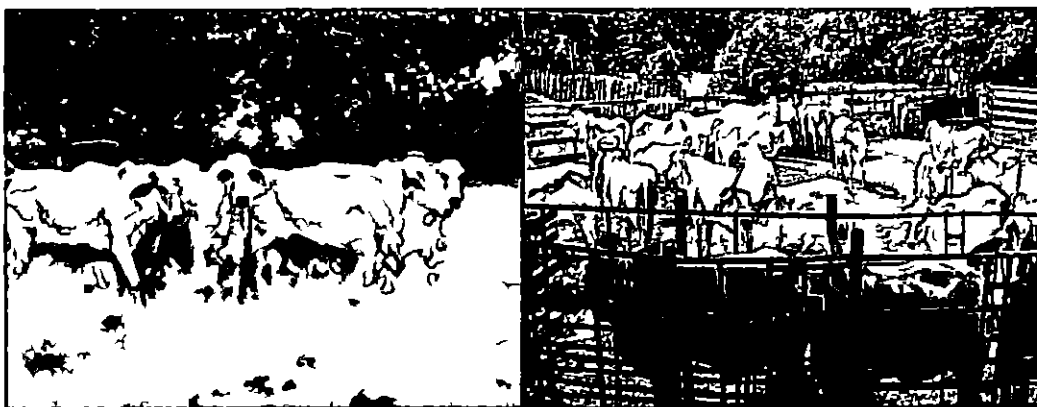
FIGURA No 5. INSTALACIONES DEL CENTRO DE INVESTIGACIONES EN BIOTECNOLOGÍA AGROPECUARIA.



La duración de esta investigación fue de aproximadamente diez meses. En la misma se utilizaron 16 novillas de la raza Brahman, con edades de entre 34 y 46 meses, con pesos entre 820 y 1125 libras, condición corporal de 3.5 a 4.0 (escala de 1 a 5) y todas se encontraban ciclando (presencia de cuerpo lúteo en uno de sus ovarios). El grupo estuvo sometido a un régimen alimenticio a

base de pastoreo en una asociación entre pasto *Brachiana decumbens* *Brachiana brizantha* con suministro de una mezcla sal mineral en consumo *ad libitum*. Todas fueron sometidas a extracción ovocitaria mediante aspiración folicular transvaginal guiada por ecografía.

FIGURA No 6 HEMBRAS UTILIZADAS EN LA INVESTIGACIÓN



Para tal fin se empleó un ecógrafo Esaote Aquila® con un transductor convexo de 5 MHz acoplado en una guía de punción ovárica con una cánula de 18G x 55 cm la cual estaba unida a una bomba de vacío (Cook® VMAR 5000) por medio de una tubería de silicona equipada con filtros de recolección.

FIGURA No 7. EQUIPOS EMPLEADOS EN LA ASPIRACIÓN: 1. ECÓGRAFO, 2. TRANSDUCTOR, 3. BOMBA DE VACÍO, 4. GUÍA DE PUNCIÓN, 5. CÁNULA, 6. FILTRO DE RECOLECCIÓN 7. TUBERÍA DE SILICONA.



En la preparación de los animales para la aspiración transvaginal, las vacas fueron sedadas y el recto fue relajado con Xilacina al 2% (0.5 ml/vaca IM) y se realizó anestesia epidural con Lidocaina al 2% (3.0 ml/vaca) para prevenir las contracciones rectales y facilitar la manipulación de los ovarios. El recto fue vaciado manualmente e higienizada la región perineal por medio de un lavado con agua y detergente y luego limpiada con alcohol al 70%.



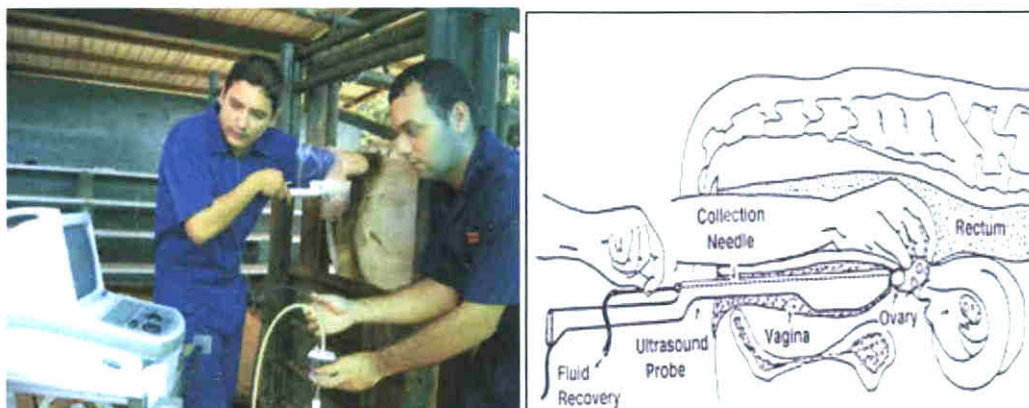
FIGURA No 8. SEDACIÓN, VACIADO RECTAL Y LIMPIEZA DE LOS ANIMALES EMPLEADOS



Posteriormente se procedió a introducir el transductor por vía vaginal, cubierto con un protector con gel para ultrasonografía. Los ovarios se manipularon rectalmente de forma tal forma que se colocaron estos contra el transductor y visualizaron los folículos en la pantalla del ecógrafo. Con la aguja se atravesó la pared vaginal, puncionando de esta forma los folículos entre 3 y 9 mm de diámetro, en este momento se aplicó presión de vacío de 50 a 65 mmHg y se recogió el aspirado folicular en los filtros de recolección, conteniendo medio de aspiración (PBS + heparina 10 UI/ml).



FIGURA No 9. PROCEDIMIENTO REALIZADO EN LA EXTRACCIÓN DE LOS OVOCITOS



Posteriormente el medio de colección (conteniendo el líquido folicular aspirado, junto a los ovocitos), fue llevado hasta el laboratorio para realizar la búsqueda y evaluar la calidad morfológica de los complejos cumulus-ovocito (COCs) obtenidos.

FIGURA No 10. COLECTA, BÚSQUEDA Y SELECCIÓN DE LOS OVOCITOS



La calidad de los COCs fue evaluada empleando la escala de uno a cuatro según los criterios de selección propuestos por de Loos et al. (1989). Donde los COCs de grado uno fueron considerados excelentes, grado dos: buenos, grado

tres regulares y grado cuatro malos. Los COCs de grado uno al tres se consideran aptos para fecundación in vitro en tanto que los de grado cuatro no. Los criterios de evaluación de los COCs fueron basados en el número de capas de células del cumulus, su compactación y homogeneidad, mientras que en el ovocito se apreció la transparencia y homogeneidad del citoplasma distribuyéndose de la siguiente manera:

#### Grado uno

- Cumulos con capas múltiples
- Cumulus compacto
- La totalidad del cumulus es clara y transparente
- Citoplasma homogéneo

#### Grado dos

- Cumulus como grado uno o algo más oscuro y menos transparente
- Citoplasma con granulación más gruesa y más oscura en la periferia que en grado uno

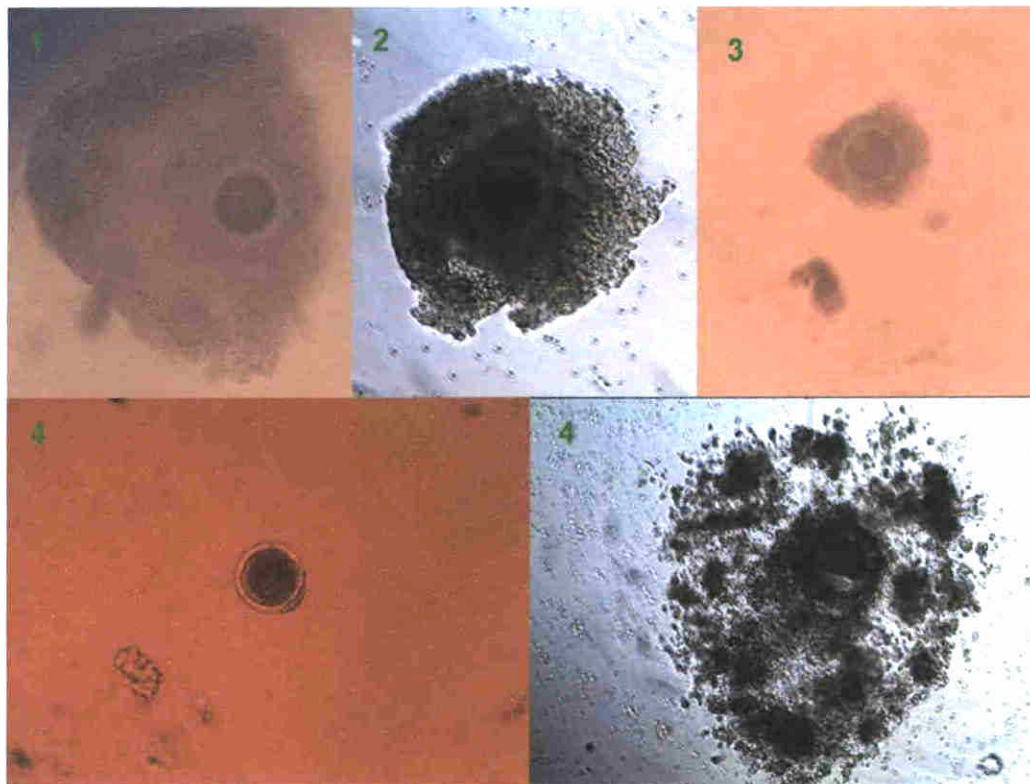
#### Grado tres

- Cumulus menos compacto, más oscuro que en uno o dos
- Citoplasma con manchas oscuras

#### Grado cuatro

- Sin cumulus o expandido

FIGURA No 11. GRADOS DE CALIDAD (UNO, DOS, TRES Y CUATRO) DE LOS OVOCITOS COLECTADOS



Las vacas fueron sometidas a sesiones de aspiración folicular puncionándose todos los folículos entre 3 y 9 mm de diámetro, durante un periodo de siete semanas, conformándose dos grupos según la frecuencia de punción:

- Grupo uno: una vez a la semana.
- Grupo dos: dos sesiones por semana.

Tres días previos al inicio de la primera sesión de aspiración, las ondas foliculares de los animales se sincronizaron mediante dos métodos:

- Método hormonal: aplicación de 2 mg benzoato de estradiol (Over®) y 50 mg de progesterona (Gestavec 25®) por vía intramuscular.

- Método de punción todos los folículos mayores o iguales a 3 mm presentes en los ovarios fueron puncionados

Se aplicaron cuatro tratamientos (cuatro animales por tratamiento)

- Tratamiento 1 Se sincronizó la onda mediante punción folicular y se realizó una aspiración semanal (T1 P1x)
- Tratamiento 2 Se sincronizó la onda mediante punción folicular y se realizaron dos aspiraciones semanales (T2 P2x)
- Tratamiento 3 Se sincronizó la onda mediante el método hormonal y se realizó una aspiración semanal (T3 H1x)
- Tratamiento 4 Se sincronizó la onda mediante el método hormonal y se realizaron dos aspiraciones semanales (T4 H2x)

Las frecuencias de dos veces a la semana fueron realizadas a intervalos de 3 5 días de modo que se realizaban aspiraciones los martes en la mañana y los viernes en la tarde en tanto que las frecuencias de una vez a la semana (intervalo de siete días) fueron realizadas los miércoles por la mañana

Luego de finalizadas las siete semanas de aspiración las vacas fueron tratadas con Oxitetraciclina vía intramuscular según dosis recomendada de acuerdo al peso e inmediatamente sometidas a un periodo de 15 días de descanso Posteriormente todos los animales fueron sincronizados colocándoles un implante de progestágeno en la oreja más solución de valerato de estradiol y Norgestomend (Crestar®) intramuscular El implante fue retirado pasado nueve días seguido de una aplicación intramuscular de cloprostenol (Sincroplex®) a razón de 3 ml por animal Se realizó observación visual (mañana y tarde) de

observación visual (mañana y tarde) de todos los animales a partir de las 24 horas de retirado el implante para comprobar la presentación del celo

### **Parámetros evaluados**

- Cantidad de folículos aspirados por semana y sesión por tratamiento
- Cantidad de los complejos cumulus ovocito obtenidos por semana y sesión por tratamiento
- Calidad morfológica de los complejos cumulus ovocitos obtenidos por tratamiento
- Presentación del celo posterior al tratamiento

### **Análisis estadístico**

Los tratamientos fueron analizados mediante un diseño de bloques completamente al azar con arreglo factorial 2x2 y se trabajó con un nivel de significancia de  $\alpha$  0.05. El número promedio de folículos aspirados, de ovocitos recuperados y de ovocitos por calidad fue analizado empleando el procedimiento GLM de SAS (The SAS System).

**CUADRO II ANÁLISIS DE VARIANZA DEL MODELO ESTADÍSTICO**

<b>Fuente de variación</b>	<b>Grados de libertad</b>		
Bloques	(B - 1)	=	6
Tratamientos	(T - 1)	=	3
Sincronización	(S - 1)	=	1
Aspiración	(A - 1)	=	1
Sincr x Asp	(S - 1) (A - 1)	=	1
Error experimental	(T - 1)(B - 1)	=	18
<b>Total</b>	<b>(SAR - 1)</b>	<b>=</b>	<b>27</b>

**Modelo lineal aditivo**

El modelo lineal aditivo o modelo matemático planteado es el siguiente

$$Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \alpha_j + \beta_k + (\alpha\beta)_{jk} + e_{ijk}$$

#### 4 RESULTADOS Y DISCUCION

El análisis de varianza del numero de folículos aspirados (NFA) y del promedio total de complejos cumulus ovocitos (COCs) recuperados por semana en cada tratamiento reveló diferencias significativas ( $P < 0.01$ ) entre tratamientos

Las diferencias encontradas entre animales ( $P < 0.01$ ) consideramos son debidas a la variación individual en cuanto al numero de foliculos presentes en el ovario posteriormente a la sincronización de la onda. Es interesante puntualizar que incluso entre animales de la misma raza en iguales condiciones reproductivas como fue publicado por Solis (2006) en estudios de la dinámica folicular en hembras bovinas o como mencionaron Bó y Mapletoft (1999) existen factores individuales que determinan las características de la dinámica folicular ovárica

La variación encontrada entre semanas ( $P < 0.01$ ) para el numero de folículos aspirados y el total de COCs recuperados fue analizada a través de análisis de regresión y no se ajustaron a modelos de regresión lineales ni cuadráticos

CUADRO III ANÁLISIS DE VARIANZA DEL PROMEDIO TOTAL DE OVOCITOS RECUPERADOS EN CADA TRATAMIENTO GL GRADOS DE LIBERTAD CV COEFICIENTE DE VARIACIÓN BLK BLOQUES TRT TRATAMIENTO REP REPLICAS

Procedimiento de Modelo Lineal Corregido				
Variable Dependiente Total de Complejos Cumulus Ovocito				
Fuente	GL	Suma de cuadrados	Valor de F	Pr > F
Modelo	39	3122 53571429	3 41	0 0001
Error	72	1688 57142857		
Total Corregido	111	4811 10714286		
R Cuadrado		C V	Media total	
0 649026		32 09407	15 0892857	
Fuente	GL	Tipo I SS	F Value	Pr > F
BLK	6	524 48214286	3 73	0 0028
TRT	3	1387 25000000	19 72	0 0001
REP(TRT)	12	852 42857143	3 03	0 0017
BLK TRT	18	358 37500000	0 85	0 6385

En el Cuadro IV se observa que el tratamiento uno (T1 P1x sincronización de la onda folicular por puncion y frecuencia de aspiración una vez a la semana) no difirió ( $P>0.01$ ) del tratamiento tres (T3 H1x sincronización de la onda folicular por método hormonal y frecuencia de aspiración una vez a la semana) En tanto que el T1 P1x y el T3 H1x difirieron ( $P<0.01$ ) de los tratamientos dos (T2 P2x sincronización de la onda folicular por punción y frecuencia de aspiración dos veces a la semana) y cuatro (T4 H2x sincronización de la onda folicular por método hormonal y frecuencia de aspiración dos veces a la semana) que no difirieron entre sí



CUADRO IV NUMERO DE FOLÍCULOS ASPIRADOS OVOCITOS RECUPERADOS Y PORCENTAJE DE RECUPERACIÓN DE OVOCITOS POR SEMANA

<i>TRT</i>	<i>Intervalo (días)</i>	<i>COCs ±EE</i>	<i>NFA ±EE</i>	<i>% Recuperación</i>
T1 P1x	7	12 0 ±0 8 <sup>a</sup>	18 5 ±1 3 <sup>a</sup>	65
T2 P2x	3 5	17 6 ±0 8 <sup>b</sup>	35 5 ±1 3 <sup>b</sup>	50
T3 H1x	7	11 3 ±0 8 <sup>a</sup>	18 4 ±1 3 <sup>a</sup>	61
T4 H2x	3 5	19 5 ±0 8 <sup>b</sup>	36 2 ±1 3 <sup>b</sup>	54

Las diferencias entre tratamientos observadas por nosotros concuerdan con lo publicado por Van der Schans et al (1991) García y Salaheddine (1998) y Viana et al (2004) quienes encontraron un mayor numero de folículos aspirados y ovocitos recuperados por semana cuando los animales eran sometidos a dos sesiones de aspiración en lugar de una García y Salaheddine (1998) arribaron a la conclusión de que la aspiración folicular parecía inducir y sincronizar las ondas foliculares lo que tiene un efecto positivo sobre el numero de folículos disponibles para la aspiración (Simón et al 1993) y por consiguiente sobre el numero de COCs recuperados por semana Puede asumirse que el folículo dominante es eliminado en cada sesión cuando una vaca es aspirada dos veces por semana estimulando una onda adicional de folículos más pequeños (Bergfelt et al 1994)

Las similitudes encontradas en cuanto al numero de folículos disponibles para la aspiración y el numero de COCs colectados entre tratamientos (T1 P1x vs T3 H1x y T2 P2x vs T4 H2x) indican que cuando se sincroniza la onda folicular ya sea por punción folicular o por el método hormonal los resultados no difieren significativamente ( $P>0.01$ ) En un experimento similar Bacelar et al (2010) utilizaron novillas Nelore y encontraron una mejor respuesta en cuanto a numero de folículos aspirados y COCs recuperados

cuando la sincronización de la onda fue realizada con estradiol mas progesterona y prostaglandina que cuando fue sincronizada mediante aspiración y prostaglandina. Por otra parte Goodhand et al (2000) luego del tratamiento con estradiol más progesterona y sin sincronización hormona dos días después del celo tampoco encontraron diferencias entre tratamientos. Lo cual puede ser debido a que en este caso la aspiración se realizó dos días después del celo en los animales donde no se sincronizó la onda folicular.

Los promedios semanales de numero de folículos aspirados estuvieron en el orden de  $18.5 \pm 1.3$ ,  $35.5 \pm 1.3$ ,  $18.4 \pm 1.3$  y  $36.2 \pm 1.3$  para el T1 P1x, T2 P2x, T3 H1x y T4 H2x respectivamente. El numero de COCs recuperados por semana por tratamiento fue de  $12.0 \pm 0.8$ ,  $17.6 \pm 0.8$ ,  $11.3 \pm 0.8$  y  $19.5 \pm 0.8$  para los tratamientos T1 P1x, T2 P2x, T3 H1x y T4 H2x respectivamente. Al respecto no se encontró en la literatura investigaciones que comparen estadísticamente el numero de folículos aspirados y/o los COCs recuperados por semana. Sin embargo, Chaubal et al (2006) encontraron en vacas Angus  $7.8 \pm 2.4$  y  $13.0 \pm 3.5$  folículos aspirados por semana con frecuencias de una y dos veces a la semana respectivamente y recuperaron  $4.6 \pm 1.9$  y  $7.9 \pm 2.9$  COCs en igual régimen de aspiración. Estos resultados son evidentemente más bajos que los nuestros considerando que gran cantidad de estudios demuestran mayor respuesta en ganado Bos indicus debido a que los animales Bos indicus presentan naturalmente mayor numero de folículos por onda COCs (Blaschi et al 2004) como indica Cruz et al (2009) cuando encontraron un promedio de 16.3 COCs procedente de vacas Bos indicus versus 4.6 COCs procedentes de vacas Bos taurus. De cualquier forma podemos decir que nuestro hallazgo en cuanto a numero de folículos

aspirados y COCs recuperados se corresponden a los patrones descritos en animales *Bos indicus* señalados por autores como Viana et al (2003) Viana et al (2004) y Ramos et al (2006)

El porcentaje de recuperación para los tratamientos T1 P1x T2 P2x T3 H1x y T4 H2x fueron de 65 50 61 y 54% respectivamente De igual forma Viana et al (2003) encontraron mayores tasas de recuperación cuando se realizaba una frecuencia de aspiración semanal que cuando se realizaban dos aspiraciones semanales sin embargo sus valores fueron un poco mayores (74 3% versus 59 9%) Tasas de recuperación mucho más bajas a las obtenidas en nuestro trabajo fueron reportadas por Broadbent et al (1997) (32 3 28 4 y 20 1%) cuando se realizaron aspiraciones una vez a la semana durante 4 8 y 12 semanas respectivamente Petyin et al (2003) obtuvieron tasas de recuperación algo similares a las nuestras (58 5 y 45 6%) con aspiraciones en distintas fases del ciclo estral En estudios realizados por Ramos et al (2006) publicaron un 71 39% de recuperación cuando aspiraron vacas Gir dos veces a la semana En tanto que Yang et al (2005) alcanzaron valores de 76 2 70 3 y 66 6% en vacas aspiradas una vez a la semana No obstante es importante acotar que el porcentaje de recuperación está influido por multiples factores que dependen tanto del sistema de aspiración empleado como de factores inherentes al propio individuo

Cuando el numero de folículos aspirados y el total de COCs recuperados por tratamiento fueron analizados por sesiones de aspiración (Cuadro V) se obtuvieron promedios de numero de folículos aspirados de  $18.5 \pm 1.2$   $17.8 \pm 1.2$   $18.4 \pm 1.2$  y  $18.1 \pm 1.2$  y recuperándose  $12.0 \pm 0.6$   $8.8 \pm 0.6$   $11.3 \pm 0.6$  y

9.7  $\pm$  0.6 COCs para el T1 P1x T2 P2x T3 H1x y T4 H2x respectivamente. Al respecto Viana et al (2003) con vacas no lactantes de la raza Gir a intervalos de una y dos aspiraciones a la semana obtuvieron 12.1  $\pm$  0.6 y 11.6  $\pm$  0.6 folículos aspirados al tiempo que recuperaron 8.9  $\pm$  0.8 y 7.0  $\pm$  0.7 COCs respectivamente. Ramos et al (2006) aspiraron dos veces a la semana vacas no lactantes de la misma raza y publicaron 13.63  $\pm$  5.85 folículos aspirados y 9.73  $\pm$  8.13 COCs recuperados por sesión. Por otro lado valores mucho menores a los nuestros de folículos aspirados (11  $\pm$  4.5 y 7.2  $\pm$  2) y COCs recuperados (7.4  $\pm$  3.3 5.4  $\pm$  3.0) fueron reportados por Bacelar et al (2010) con novillas Nelore de baja condición corporal (2.5 en la escala de 1 a 5) y sincronización de la onda con progesterona y estradiol versus sincronización por punción. Yang et al (2005) una vez a la semana con razas europeas asiáticas y sus híbridos encontraron 10.1  $\pm$  0.7 11.7  $\pm$  0.5 y 11.4  $\pm$  0.5 folículos aspirados y 7.7  $\pm$  0.4 7.8  $\pm$  0.5 y 8.0  $\pm$  0.5 COCs recuperados respectivamente. Algunos otros autores han publicado valores menores por sesión de aspiración empleando razas europeas (Gibbons et al 1994 Garcia y Salaheddine 1998 Broadbent et al 1997 Chaubal et al 2006).

En cuanto al número de folículos aspirados por sesión no se encontraron diferencias significativas entre tratamientos ( $P > 0.05$ ). Sin embargo, el total de COCs recuperados fue mayor ( $P < 0.05$ ) cuando los animales fueron aspirados una vez a la semana. Estos resultados concuerdan con lo reportado por Viana et al (2003) cuando aspiraron vacas Gir a frecuencias de una y dos veces por semana y no encontraron diferencias en el número de folículos aspirados por sesión (12.1  $\pm$  0.6 versus 11.6  $\pm$  0.6  $P > 0.05$ ) pero más COCs

fueron recuperados en la frecuencia de una vez a la semana ( $8.9 \pm 0.8$  versus  $7.0 \pm 0.7$   $P < 0.01$ ) en lugar de dos veces a la semana. Contrariamente Van der Schans et al (1991) Garcia y Salaheddine (1998) con novillas Holstein Friesian Gibbons et al (1994) y Chaubal et al (2006) con vacas Angus reportaron que la frecuencia de recolección de una o dos veces a la semana no afectó el número de folículos aspirados ni el número de COCs por sesión. En concordancia con Viana et al (2003) la mayor eficiencia en la recuperación de COCs en vacas con menor frecuencia de aspiración puede estar relacionada con un periodo de tiempo mayor que permite sanar las lesiones provocadas y por consiguiente una mayor facilidad durante la manipulación de los ovarios en las sesiones posteriores o para la reabsorción de los folículos llenos de sangre que pueden ser identificados incorrectamente como folículos aptos para la aspiración. Unido a esto la baja calidad del bloqueo anestésico luego de varias sesiones de OPU también se cree pudieran contribuir negativamente a una más baja tasa de recuperación de ovocitos en los animales aspirados dos veces por semana (Viana et al 2003).

CUADRO V. PROMEDIO TOTAL DE OVOCITOS RECUPERADOS Y NÚMERO DE FOLÍCULOS ASPIRADOS POR SESIÓN DE ASPIRACIÓN

<i>TRT</i>	<i>Sesiones (n)</i>	<i>COCs ±EE</i>	<i>NFA ±EE</i>
T1 P1x	28	12.0 ±0.6 <sup>a</sup>	18.5 ±1.2 <sup>a</sup>
T2 P2x	56	8.8 ±0.6 <sup>b</sup>	17.8 ±1.2 <sup>a</sup>
T3 H1x	28	11.3 ±0.6 <sup>a</sup>	18.4 ±1.2 <sup>a</sup>
T4 H2x	56	9.7 ±0.6 <sup>b</sup>	18.1 ±1.2 <sup>a</sup>

En el análisis de calidad de los ovocitos (Cuadro VI) no se encontraron diferencias ( $P>0.05$ ) entre el T1 P1x con el T3 H1x y el T2 P2x tampoco difirió ( $P>0.05$ ) del T4 H2x. Esta tendencia refleja claramente que el efecto de la sincronización de la onda folicular ya sea por punción u hormonal no tiene ningún efecto sobre la calidad de los ovocitos recuperados tal y como coincidieron con nosotros Bacelar et al (2010) quienes adoptaron una escala de clasificación un tanto similar a la nuestra y no encontraron grandes diferencia entre las calidades de los ovocitos cuando sincronizaron la onda con estradiol y progesterona versus punción folicular excepto en los COCs de grado dos donde sí reportaron diferencias y Goodhand et al (2000) que tampoco encontraron diferencias en calidad de ovocitos cuando compararon tratamientos con estradiol más progesterona versus tratamiento sin hormonas. Otros autores han realizado pre estimulación con otras hormonas como FSH (Gibbons et al 1994 Bungartz et al 1995) y no han observado diferencias en la calidad de COCs colectados entre vacas pre estimuladas o no.

CUADRO VI GRADOS DE CALIDAD DE LOS OVOCITOS ASPIRADOS POR TRATAMIENTO

TRT	COCs	Aptos para FIV			No aptos para FIV
		Ov1 $\pm$ EE	Ov2 $\pm$ EE	Ov3 $\pm$ EE	Ov4 $\pm$ EE
T4 H2x	19.5	3.1 <sup>a</sup> $\pm$ 0.3	4.9 <sup>a</sup> $\pm$ 0.4	8.8 <sup>a</sup> $\pm$ 0.7	2.7 <sup>a</sup> $\pm$ 0.3
T2 P2x	17.6	2.7 <sup>a</sup> $\pm$ 0.3	4.4 <sup>ab</sup> $\pm$ 0.4	8.4 <sup>a</sup> $\pm$ 0.7	2.1 <sup>ab</sup> $\pm$ 0.3
T1 P1x	12.0	1.6 <sup>b</sup> $\pm$ 0.3	3.7 <sup>bc</sup> $\pm$ 0.4	5.1 <sup>b</sup> $\pm$ 0.7	1.6 <sup>b</sup> $\pm$ 0.3
T3 H1x	11.3	1.3 <sup>b</sup> $\pm$ 0.3	2.6 <sup>c</sup> $\pm$ 0.4	5.9 <sup>b</sup> $\pm$ 0.7	1.5 <sup>b</sup> $\pm$ 0.3

En cuanto al numero de ovocitos de mayor calidad ( $P < 0.05$ ) que presentaron el T2 P2x y el T4 H2x sobre el T1 P1x y el T3 H1x ( $P < 0.05$ ) a nuestro criterio se debió lógicamente al mayor número de ovocitos colectados por efecto de la aspiración dos veces a la semana en lugar de una. Por tal motivo la calidad de los ovocitos fue evaluada porcentualmente (Cuadro VII)

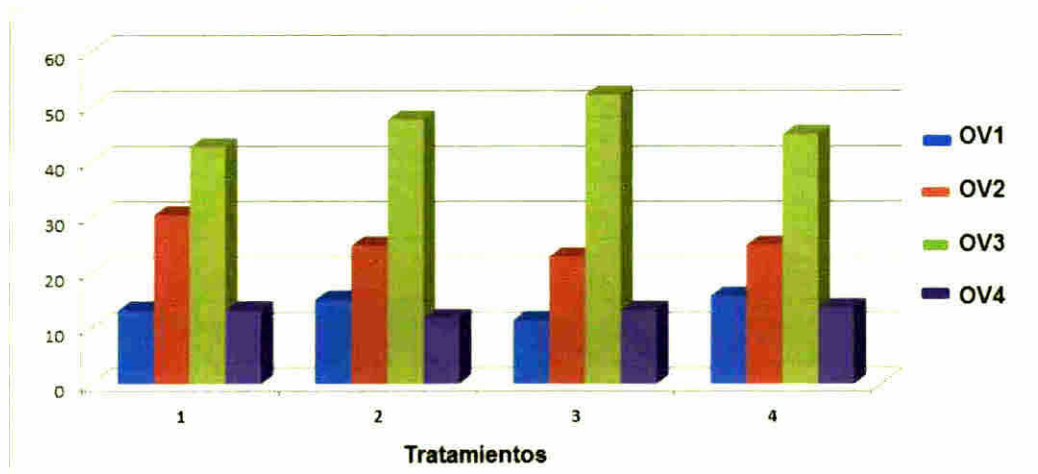
CUADRO VII PORCENTAJE DE GRADOS DE CALIDAD DE COCS OBTENIDOS POR TRATAMIENTO

TRT	COCs (n)	Aptos para FIV			No aptos para FIV
		Ov1 (%)	Ov2 (%)	Ov3 (%)	Ov4 (%)
T1 1Xp	337	13.3 a	30.5 a	42.8 a	13.3 a
T2 2xp	493	15.3 a	25.0 a	47.7 a	11.9 a
T3 1Xh	301	11.5 a	23.0 a	52.2 a	13.3 a
T4 2xh	545	15.9 a	25.1 a	45.1 a	13.8 a

Cuando fueron evaluados los porcentajes por grados de calidad de los COCs recuperados por tratamiento no se encontraron diferencias estadísticas ( $P > 0.05$ ) entre tratamientos. Esto nos permite inferir que las frecuencias de aspiración de una o dos veces a la semana no afectaron la calidad de los COCs recuperados. Estos resultados concuerdan con lo mencionado por Seneda et al (2001) quienes afirman que la calidad de los ovocitos no cambia dependiendo de la etapa del ciclo estral. Sin embargo, discrepan con lo descrito por Simon et al (1993) y Merton et al (2003) quienes aducen una mejor calidad de ovocitos cuando las vacas son aspiradas a intervalos de tres o cuatro días en lugar de siete días. Al respecto Chaubal et al (2006) encontraron igual calidad de ovocitos en vacas aspiradas una o dos veces a la semana y no en tanto. Viana et al (2004) reportaron mayor calidad de

COCs cuando se realizaron frecuencias de dos aspiraciones semanales en lugar de una.

FIGURA No 12. GRADOS DE CALIDAD DE LOS COCS POR TRATAMIENTOS



En cuanto a los grados de calidad de los COCs, se reflejó en todos los tratamientos una tendencia a obtener mayor calidad de ovocitos de grado tres, seguida de los de grado dos y de los de grado uno y cuatro que se mostraron similares (Figura No 12). En concordancia con nuestro hallazgo, Bacelar et al. (2010), usaron una escala de clasificación bastante similar a la nuestra y encontraron mayor cantidad de COCs de tercera categoría, seguido de los de segunda categoría y finalmente los de cuarta y primera categoría. En frecuencias de una y dos veces a la semana, Chaubal et al. (2006), igualmente encontraron mayor cantidad de ovocitos de tercera categoría, sin embargo, el número de ovocitos desnudos o de cuarta categoría fue mayor a los de grado uno y dos, aun cuando estos dos últimos fueron agrupados en



un solo número. De las variaciones encontradas es importante puntualizar que al igual que el porcentaje de recuperación la calidad de los ovocitos puede ser influenciada en gran medida por aspectos técnicos como el procedimiento de aspiración tipo de aguja y diámetros y la presión de vacío de aspiración (Palma et al 2008)

Como resultado colateral a la investigación se estudió el efecto de la aspiración folicular sobre el restablecimiento del ciclo estral en las hembras donadoras de ovocitos. Luego de la sincronización con progestágeno más estradiol (Crestar®) y prostaglandina (Sincroplex®) realizada a todos los animales después de 15 días de descanso una vez finalizado el período de aspiración se evidenció claramente el celo en 15 de los 16 animales empleados en el estudio. De modo que se demostró que las sesiones de aspiración no afectaron el ciclo sexual de las hembras trabajadas. A pesar de que escasos son los informes sobre el impacto de la aspiración folicular transvaginal sobre la salud de la donante y su comportamiento reproductivo futuro (Palma 2008) algunos autores al igual que nosotros han encontrado que el procedimiento no afectó la capacidad de presentar un nuevo estro (Donnay et al 1997 Maillard et al 2003) e incluso la fertilidad (Donnay et al 1997)



## 5 CONCLUSIONES

De acuerdo con nuestros resultados podemos arribar a las siguientes conclusiones

Empleando la técnica de aspiración folicular transvaginal en donantes de alto potencial genético se pueden obtener COCs aptos para fecundación in vitro de acuerdo a los resultados de las evaluaciones morfológicas de los mismos

No existen diferencias significativas para numero de folículos aspirados numero de COCs obtenidos y calidad de COCs recuperados independientemente del método de sincronización de la onda folicular utilizado (punción folicular o sincronizacion hormonal)

La frecuencia de aspiración dos veces a la semana permite la disponibilidad de mayor numero de foliculos para la aspiración y más complejos COCs por semana. Empero igual cantidad de foliculos y mayor cantidad de COCs son obtenidos por sesión de aspiración cuando se emplea la frecuencia de aspiracion una vez a la semana

Las frecuencias de aspiración de una o dos veces a la semana no afectan la calidad de los ovocitos recuperados

La tecnica de aspiracion folicular transvaginal empleada de forma repetida durante siete semanas no afecto la actividad sexual de los animales ya que los mismos pudieron restablecer su ciclicidad después de finalizado el tratamiento

## **6 RECOMENDACIONES**

Sobre la base de nuestros resultados podemos recomendar

Si se van a emplear vacas que no se conoce el momento del ciclo en que se encuentran en el momento de realizar la aspiración recomendamos el empleo del tratamiento de sincronización hormonal (Estradiol más progesterona) Debido a que esta sincronización puede ser realizada en la finca por cualquier operador y elimina la necesidad de una visita adicional para la aspiración de los folículos de la onda presente

En caso que se disponga de donadoras permanentes la aspiración dos veces a la semana sería la frecuencia de elección ya que aporta la mayor cantidad de COCs para los programas de FIV

## REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Adams G P Matteri R L Kastelic J P Ko J C Ginther O J 1992 Association between surges of follicle stimulating hormone and the emergence of follicular waves in heifers Journal of Reproduction and Fertility 94 177 188
- Adams G P Kot K Smith C A Ginther O J 1993 Effect of a dominant follicle on regression of its subordinates in heifers Can J Anim Sci 73 267 275
- Aerts J M J Oste M Bols P E J 2004 Development and practical applications of a method for repeated transvaginal ultrasound-guide biopsy collection of the bovine ovary Proceedings of the 15th ICAR Porto Seguro Brasil Abstract 2 435
- Aller J F N C Muccia G G Kaisera G Riosa S S Callejas R H Alberioa 2009 Transvaginal follicular aspiration and embryo development in superstimulated early postpartum beef cows and subsequent fertility after artificial insemination Animal Reproduction Science 19(2010) 1 18
- Argov N Arav A Sklan D 2004 Number of oocytes obtained from cows by OPU in early but not late lactation increased with plasma insulin and estradiol concentrations and expression of mRNA of the FSH receptor in granulosa cells Theriogenology 61 947 962
- Bacelar D Constantino M Padilha L Barreiros T M M Seneda 2010 Incremento na obtenção de oócitos em novilhas Nelore (Bos taurus

- indicus) tratadas com progesterona injetavel e benzoato de estradiol  
Ciencias Agrárias Londrina 31(1) 163 172
- Badtram G A Gaines J D Thomas C B Bosu W T K 1991 Factors  
influencing the accuracy of early pregnancy detection in cattle by real  
time ultrasound scanning of the uterus Theriogenology 35 1153 1 167
- Bage Renee Petyim Sudsaijai Larsson Birgitta Hallap Triin Bergqvist Ann  
Sofi Gustafsson Hans Rodriguez M Heriberto 2003 Oocyte  
competence in repeat breeder heifers effects on optimized ovum pick up  
schedule on expression of oestrus follicular development and fertility  
Reproduction Fertility and Development (15) 115 123
- Baker T 1963 A quantitative and cytological study of germ cells in human  
ovaries Proceedings of Royal Society of London 158 417-433
- Ball P J H Peters A R 2006 Reproducao em bovinos 3 ed Sao Paulo  
Brasil pp 195 198
- Banks W J 1991 Sistema reprodutor feminino Histologia Veterinaria Aplicada  
2ª ed Sao Paulo Brasil Manole Trad Francisco Javier Hernandez  
Blazquez Maria Lucia Zaidan Dagli
- Bedel Stenzel M Anderson R Heasman J Willie C 1988 The origin and  
migration of primordial germ cells in the mouse Seminars in cell and  
developmental biology 9 393-400
- Bellenda O G 2003 La ecografia aplicada a la reproducción en especies de  
interes productivo (en línea) Consultado 3 de dic 2010 Disponible en

[http://www.produccion animal.com.ar/informacion\\_tecnica/ecografia\\_ultrasonido/11\\_ecografia\\_aplicada.pdf](http://www.produccion animal.com.ar/informacion_tecnica/ecografia_ultrasonido/11_ecografia_aplicada.pdf)

Bergfelt DR Lightfoot KC Adams GP 1994 Ovarian dynamics following ultrasound guided transvaginal follicle ablation in heifers Theriogenology 42 895 907

Bielanska Osuchowska Z 2006 Oogenesis in pig ovaries during the prenatal period ultrastructure and morphometry Reproductive biology 6 161 193

Blaschi W Andrade E R Nonato Junior I Pontes J H F Ereno Junior J C Uvo S Seneda M M 2004 Utilizaçao previa do Pluset na aspiraçao follicular impacto na produçao in vitro de embrioes em vacas Bos indicus Acta Scientiae Veterinariae 32 186 (Abstract)

Bo G A y Mapletoft R J 1999 Control del desarrollo folicular y su aplicacion en programas de superovulacion de donantes de embriones (en linea) Córdoba Argentina Consultado 24 de nov 2010 Disponible en [http://www.produccion animal.com.ar/informacion\\_tecnica/transplante\\_embriionario/01\\_control.htm](http://www.produccion animal.com.ar/informacion_tecnica/transplante_embriionario/01_control.htm)

Bo G A y Caccia M 2000 Ultrasonografía reproductiva en el ganado bovino (en línea) Córdoba Argentina Consultado 3 de dic 2010 Disponible en [http://www.produccion animal.com.ar/informacion\\_tecnica/ecografia\\_ultrasonido/39\\_ultrasonografia\\_reproductiva\\_en\\_bovino.htm](http://www.produccion animal.com.ar/informacion_tecnica/ecografia_ultrasonido/39_ultrasonografia_reproductiva_en_bovino.htm)

Bo G A Medina M Tegli J C Costamagna A Brogliatti G M 2000 Fixed time artificial insemination in CIDR B treated cows induced to ovulate with

estradiol benzoate or GnRH En Proc 14th International Congress on Animal Reproduction (ICAR) Stockholm Sweeden pp 34-42

Bo G A 2002 Dinamica folicular y tratamientos hormonales para la sincronizar la ovulacion en el ganado bovino (en linea) Córdoba Argentina Consultado 24 de nov 2010 Disponible en [http //www avpa ula ve/congresos/cd\\_xi\\_congreso/pdf/grabielbofr PDF](http://www.avpa.ula.ve/congresos/cd_xi_congreso/pdf/grabielbofr.pdf)

Bols P E J Van Soom A Ysebaert M T Vandenheede J M M Kruif A 1996 Effects of aspiration vacuum and needle diameter on cumulus oocyte complex morphology and developmental capacity of bovine oocytes Theriogenology 45 1001 10014

Bols P E J Ysebaert M T Van Soom A Kruif A 1997 Effects of needle tip level and aspiration procedure on the morphology and developmental capacity of bovine compact cumulus oocytes complexes Theriogenology 47 1221 1236

Bols P E J Ysebaert M T Lein A Coryn M Van Soom A de Kruif A 1998 Effect of long term treatment with bovine somatotropin on follicular dynamics and subsequent oocyte and blastocyst yield during OPU FIV program Theriogenology 49 983 995

Bols P E J Ysebaert M T Lein A de Kruif A 1999 Pregnancies from prepubertal heifers following repeated oocyte collection and IVF between 6 to 12 months of age Theriogenology 51 298

Bols P E J Van Holder T Leroy J L M R Van Soom A 2004 Ultrasound guided transvaginal injection of a low dose of FSH LH into the bovine ovary as

- na alternative way to simulate follicular growth preliminary result *Reprod Fert Dev* 16 230 231
- Bols P E J 2005 Puncture of mature ovarian follicles in bovine assisted reproduction *Verhandelingen Van de Koninklijke Academie Voor Geneeskunde Van Delgie LXVII* 3 177 202
- Bols P E J Leroy J L M R Viana J H M 2005b Aspectos técnicos e biológicos na recuperação de oócitos via trans vaginal guiada por ultra som em vacas *Acta Scientiae Veterinariae* 33 103 118
- Bousquet D Twagiramungu H Durocher J Barnes F L Sirard A 2000 Effect of LH injection before ovum pick up in vitro embryo production with oocytes collected at different intervals after the last FSH injection *En 15th Scientific Meeting Theriogenology* 53 347 (Abstract)
- Boyezuk D A 2007 Ecografía reproductiva Precocidad diagnóstica en nuestros establecimientos ganaderos (en línea) Buenos Aires Argentina Consultado 3 de dic 2010 Disponible en [http://www.produccionanimal.com.ar/informacion\\_tecnica/ecografia\\_ultrasonido/18\\_precocidad.pdf](http://www.produccionanimal.com.ar/informacion_tecnica/ecografia_ultrasonido/18_precocidad.pdf)
- Brad K 1994 Clinical applications of bovine Reproductive Ultrasonography *Food Animal* 16 (8) 1085 1097
- Broadbent P J Dolman D F Watt R G Smith A K Franklin M F 1997 Effect of frequency of follicle aspiration on oocyte yield and subsequent superovulatory response in cattle *Theriogenology* 45 1027–1040



- Brogliatti G M de la Fuente J Bergfelt D R Adams G P 1995 Ovarian dynamics subsequent to ultrasound guide follicle ablation in calves Proceeding of the En 11th Scientific Meeting of the European Embryo Transfer Association
- Buccione R Schroeder A C Eppig J J 1990 Interactions between somatic cells and germ cells throughout mammalian oogenesis Biology of Reproduction 43 543 547
- Bukovsky A Caudle M R Svetlikova M Upadhyaya N B 2004 Origin of germ cells and formation of new primary follicles in adult human ovaries Reproductive biology and endocrinology 2 20 20
- Bungartz L Lucas Hahn A Rath D Niemann H 1995 Collection of oocytes from cattle via follicular aspiration aided by ultrasound with or without gonadotrophin pre treatment and in different reproductive stages Theriogenology 43 667 675
- Buratini J Jr Teixeira A B Costa I B Glapinski V F Pinto M G L Giometti I C Barros C M Cao M Nicola ES Price C A 2005 Expression of fibroblast growth factor 8 and regulation of cognate receptors fibroblast growth factor receptor 3c and -4 in bovine antral follicles Reproduction 130 343 50
- Burke C R Mussard M L Gasser C L Gram D E Day M L 2003 Estradiol benzoate delay new follicular wave emergence in a dose dependent manner after ablation of the dominant ovarian follicle in cattle Theriogenology 60 647 658

- Buxade C 1995 Zootecnia Bases de la Produccion Animal Tomo I Madrid  
Esp Mundi Prensa Libros S A 306 p
- Byskov A G 1975 The role of rete ovarii in meiosis and follicle formation in the  
cat mink and ferret Journal of Reproduction and Fertility 45 201-209
- Byskov A G 1986 Differentiation of mammalian embryonic gonad Physiological  
Reviews 66 71-117
- Canipari R 1994 Cell cell interactions and oocyte growth Zygote 2 243-245
- Caravaca R F Castel G J Guzmán G J Delgado P M Mena G Alcalde A M  
Gonzales R P 2005 Bases de la Producción Animal Sevilla Esp 491 p
- Chaubal S A J A Molina C L Ohlrichs L B Ferre D C Faber P E J Bols J W  
Riesen X Tian X Yang 2006 Comparison of different transvaginal ovum  
pick up protocols to optimise oocyte retrieval and embryo production over  
a 10 week period in cows Theriogenology 65(8) 1631-48
- Chong M G Denis R G Llitas E Gallego C Fuentes D S Perez A del Valle C  
2008 Efecto de la estimulación intraovarica con ECG sobre la poblacion  
folicular y la recoleccion de ovocitos por puncion in vivo Ciencia y  
Tecnologia Ganadera 2 39-41
- Conti M Andersen C B Richard F Mehats C Chun S Y Horner K Jin C Tsafiriri  
A 2002 Role of cyclic nucleotide signaling in oocyte maturation  
Molecular and cellular endocrinology 187 153-159
- Cox N M 1997 Control of follicular development and ovulation rate in pigs  
Journal of Reproduction and fertility Supplement 52 31-46

- Cruz F B Tondello Martins L Marinho L S Forell F Vieira A Mezzalana A 2009  
Aspiração folicular em vacas *Bos taurus* e *Bos indicus* e vitrificação dos  
oócitos em condições de campo *Ciencias Agroveterinarias* 8 (2) 184  
187
- Curran S Kastelic J P Gunther O J 1989 Determining sex of bovine fetus by  
ultrasonic assesment of the relative location of the genital tubercule *Anim  
Reprod Sci* 19 17
- de Armas R Solano R Pupo C A Aguilar A Aguirre A Riego E Castro F O  
1994 Effect of the donor oocyte breed on in vitro fertilization results in  
cattle *Theriogenology* 41 186
- de Armas R 2007 Transferencia de embriones en el ganado bovino  
Universidad de Panama Facultad de Ciencias Agropecuarias Chiriqui  
Panama p 45-48
- De la Riera D 2004 La ecografia reproductiva un campo en expansion *Frisona  
Espanola* 14 102 110
- de la Sota L Formia N Lares S Fernández G 2003 Aplicaciones de la  
ultrasonografía en el manejo reproductivo de rodeos de carne y leche (en  
linea) Buenos Aires Argentina Consultado 3 de dic 2010 Disponible en  
[http //www abspecplan com br/upload/library/Aplicacoes\\_ultrassonografia\\_  
manejo\\_carne\\_leite pdf](http://www.abspecplan.com.br/upload/library/Aplicacoes_ultrassonografia_manejo_carne_leite.pdf)
- de Loos F Van Vliet C van Maurik P Kruip ThAM 1989 Morphology of  
immature bovine oocytes *Gamete Research* 24 197 204

- Demarque K C Rodrigues C F M Nogueira L A G Pinho T G Tortelly R 2003  
Histologic changes in ovaries of cows submitted to repeated follicular  
punctures *Acta Scientiae Veterinariae* 31 315
- Denis R G Prado J A Puertas N Fuentes D Bernal A S Nunez I Torres A  
Ruiz M Cardenas M 2000 Introduccion de la ultrasonografia en la  
reproducción animal Manual CIMA La Habana Cuba pp 2-40
- Denis R G 2001 Dinamica y sincronización de las ondas foliculares a través de  
la punción guiada por ultrasonografia en vacas del genotipo Criollo Tesis  
para la opcion al grado de Master en Ciencias de la Reproduccion Animal  
La Habana Cuba Universidad de la Habana
- Denis R G Lleretnı R Fuentes D S Lliteras E Chong M G Bernal A S Hayes  
O Maura R Castro F O Digo E L González A P 2004 Produccion de  
embriones bovinos a partir de ovocitos colectados por la técnica de  
puncion folicular in vivo (Ovum pick up) *Rev Cub Reprod Animal*  
30(1) 91 98
- Denis R G 2006 Obtencion de ovocitos por punción folicular in vivo (ovum pick  
up) guiada por ultrasonografía en vacas del genotipo Siboney de Cuba  
Tesis en opcion al grado de Doctor en Ciencias Veterinarias CIMA La  
Habana Cuba
- Denis R 2008 Aspiracion Folicular in vivo (OPU) una Nueva Perspectiva en el  
Campo de las Biotecnologias de la Reproduccion *Ciencia y Tecnologia  
Ganadera* 2 (2) 57 70

- Derivaux J 1980 O ciclo sexual dos mamíferos Reprodução dos animais domésticos Ed Acribia Trad Dr Renato Campanarut Barnabe
- De Roover R Genicot G Leonard S Bols P Dessy F 2005 Ovum pick up and in vitro embryo production in cows superstimulated with an individually adapted superstimulation protocol Anim Reprod Sci 86 13 25
- De Ruigh L Mullaart E Van Wagtendonk de Leeuw A M 2000 The effect of FSH stimulation prior to ovum pick up on oocytes and embryom yield Theriogenology 53 349
- DesCoteaux L Colloton J Gnemmi G 2010 Practical Atlas of Ruminant and Camelid Reproductive Ultrasonography Iowa USA Blackwell Publishing 246 p
- Diaz T 1999 Dinamica del desarrollo folicular ovarico durante el ciclo estral en el bovino Rev Fac Cien Vet UCV 40(1) 3 18
- Dode M A N Rumpf R 2002 Produção in vitro de embriões na espécie bovina Palestra proferida na Embrapa Gado de Corte Brasil
- Dolci S Williams DE Ernst MK Resnik JL Brananan CO Lock LF 1991 Requirements for mast cell growth factor for primordial germ cell survival in culture Nature 352 809 811
- Domínguez M M 1995 Effects of body condition reproductive status and breed on follicular population and oocyte quality in cows Theriogenology 43 1405 1418

- Derivaux J 1980 O ciclo sexual dos mamíferos Reprodução dos animais domésticos Ed Acribia Trad Dr Renato Campanarut Barnabe
- De Roover R Genicot G Leonard S Bols P Dessy F 2005 Ovum pick up and in vitro embryo production in cows superstimulated with an individually adapted superstimulation protocol Anim Reprod Sci 86 13 25
- De Ruigh L Mullaart E Van Wagendonk de Leeuw A M 2000 The effect of FSH stimulation prior to ovum pick up on oocytes and embryom yield Theriogenology 53 349
- DesCoteaux L Colloton J Gnemmi G 2010 Practical Atlas of Ruminant and Camelid Reproductive Ultrasonography Iowa USA Blackwell Publishing 246 p
- Diaz T 1999 Dinamica del desarrollo folicular ovarico durante el ciclo estral en el bovino Rev Fac Cien Vet UCV 40(1) 3 18
- Dode M A N Rumpf R 2002 Produção in vitro de embriões na espécie bovina Palestra proferida na Embrapa Gado de Corte Brasil
- Dolci S Williams DE Ernst MK Resnik JL Brananan CO Lock LF 1991 Requirements for mast cell growth factor for primordial germ cell survival in culture Nature 352 809 811
- Domínguez M M 1995 Effects of body condition reproductive status and breed on follicular population and oocyte quality in cows Theriogenology 43 1405 1418

- Fair T Hyttel P Greve T 1995 Bovine oocyte diameter in relation to maturational competence and transcriptional activity Mol Reprod Dev 42 437-442
- Fernandez A T 2003 Dinámica folicular funcionamiento y regulacion (en línea) Montevideo Uruguay Consultado 26 de nov 2010 Disponible en [http //www produccion animal com ar/informacion tecnica/inseminacion a rtificial/23 ondas foliculares htm](http://www.produccion_animal.com.ar/informacion_tecnica/inseminacion_artificial/23_ondas_foliculares.htm)
- Findlay J K 1994 Peripheral and local regulators of folliculogenesis Reprod Fertil Dev 6 127 139
- Fissore R A Pashen R L Bondurant R H 1986 The use of ultrasonography for the study of the bovine reproductive tract II No pregnant pregnant and pathological conditions of the uterus Anim Reprod Sci 12 167 177
- Fogwell R L J L Cowley J A Wortman N K Ames J J Ireland 1985 Luteal function in cows following destruction of ovarian follicles at midcycle Theriogenology 23 389 398
- Fortune J E 2003 The early stages of follicular development activation of primordial follicular growth of prenatal follicles Animal Reproduction Science 79 135 163
- Frandsen R D Lee W W Dee Fails A 2009 Anatomy and physiology of farm animals 7a ed Iowa USA Wiley Blackwell 533 p
- Fricke P M 2001 Manipulacion de la Funcion ovarica (en línea) Wisconsin USA Consultado 24 de nov De 2010 Disponible en

[http://vaca.agro.uncor.edu/~pleche/material/Material%20II/A%20archivos%20internet/Reproducci%F3n/du\\_605\\_es.pdf](http://vaca.agro.uncor.edu/~pleche/material/Material%20II/A%20archivos%20internet/Reproducci%F3n/du_605_es.pdf)

- Fricke P M 2004 Aplicaciones practicas del ultrasonido para el manejo reproductivo en ganado lechero (en linea) Wisconsin USA Consultado 4 de dic De 2010 Disponible en [www.wisc.edu/dysci/uwex/rep\\_phys/45pubs/ultrasound/502\\_spanish.pdf](http://www.wisc.edu/dysci/uwex/rep_phys/45pubs/ultrasound/502_spanish.pdf)
- Fry R C Simpson T C Squires T J Parr R A Damanik R M 1994 Factors affecting transvaginal oocytes pick up in heifers Theriogenology 41 197
- Galli C Crotti G Notari C Turin P Duchi R Lazzari G 2001 Embryo production by ovum pick up from live donors Theriogenology 55 1341-1357
- Garcia A y Salaheddine M 1998 Effects of repeated ultrasoundguided transvaginal follicular aspiration on bovine oocyte recovery and subsequent follicular development Theriogenology 50 575-585
- Gibbons J R Beal W E Krisher R L Faber E G Pearson R E Gwazdauskas F C 1994 Effects of once versus twice weekly transvaginal follicular aspiration on bovine oocyte recovery and embryo development Theriogenology 42 405-419
- Gigli I Russo A. Agüero A 2006 Consideraciones sobre la dinámica ovárica en equino bovino y camelidos sudamericanos In Vet 8(1) 183-204
- Ginther O J J P Kastelic L Knopf 1989 Composition and characteristics of follicular waves during the bovine estrous cycle Anim Reprod Sci 20 187-200



- Ginther O J L Knopf J P Kastelic 1989b Temporal associations among ovarian events in cattle during oestrous cycle with two and three follicular waves J Reprod Fert 87 223 230
- Ginther O J L Knopf J P Kastelic 1989c Ovarian follicular dynamics in heifers during early pregnancy Biol Reprod 41 247 254
- Ginther O J Wiltbank M C Fricke P M Gibbons J R Kot K 1996 Selection of the dominant follicle in cattle Biol Reprod 55 1187 1194
- Ginther O J K Kot L J Kulick S Martin M C Wiltbank 1996b Relationships between FSH and ovarian follicular waves during the last six months of pregnancy in cattle J Reprod Fertil 108 271 279
- Ginther O J Beg M A Donadeu F X Bergfelt D R 2003 Mechanism of follicle deviation in monovular farm species Animal Reproduction Science 78 239 257
- Gnemmi G 2004 La ultrasonografia en ginecologia buiátrica Rev Taurus 3 (12) 26 32 y 4 (13) 22 30
- Gong J G Campbell B K Bramley T A Gutierrez C G Peters A R Webb R 1996 Suppression in the secretion of follicle Stimulating Hormone and Luteinizing Hormone and ovarian follicle development in heifers continuously with a gonadotropin Releasing Hormone agonist Biol Reprod 55 68 74
- Goodman A y Hodgen G D 1983 The ovarian triad of the primate menstrual cycle Recent Progress in Hormone Research 39 1 73

Goodhand K L Watt R G Stainer M E Hutchinson J S M Broadbent J P 1999

In vivo oocyte recovery and in vitro embryo production from bovine donors aspirated at different frequencies or following FSH treatment  
Theriogenology 51 951 961

Goodhand KL Staines ME Hutchinson JSM Broadbent PJ 2000 In vivo oocyte recovery and in vitro production from bovine oocyte donors treated with progestagen oestradiol and FSH Anim Reprod Sci 63 145 158

Gordon I 1996 Controlled Reproduction in Cattle and Buffaloes Dublin Ireland  
CAB International 523 p

Hansel W Alila H W Dowd J P Milvae R A 1991 Differential origin and control mechanisms in small and large bovine luteal cells Journal of Reproduction and Fertility Suppl 43 77 89

Hanzen C y Laurent Y 1991 Application of ultrasonography in pregnancy diagnosis and evaluation of embryonic mortality rate in cattle Annales de Medecine Veterinaire 135 481-487

Hasler J F 1992 Current status and potential of embryo transfer and reproductive technology in dairy cattle Journal of Dairy Science 75 139 168

Hasler J F Henderson W B Hurtgen P J Jin Z Q McCauley A D Mower S A Neely B Shuey L S Stokes J E Trimmer S A 1995 Production freezing and transfer of bovine IVF embryos and subsequent calving results  
Theriogenology 3 141 152

- Hazeleger N L Hill D G Stubbings R B Walton J S 1995 Relationship of morphology and follicular fluid environment of bovine oocytes to their developmental potential in vitro *Theriogenology* 43 509 522
- Henao R G y Trujillo E L 2000 Establecimiento y desarrollo de la dominancia follicular bovina *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias* 13 (2) 108 120
- Hendriksen P J M 2004 Effect of different stages of the follicular wave on in vitro developmental competence of bovine oocyte *Theriogenology* 61 909 920
- Heyman I Chavatte Palmer Pascale LeBourhis D Camous S Vignon X Renard J P 2002 Frequency and occurrence of late-gestation losses from cattle cloned embryos *Biology or Reproduction* 66 6 13
- Holly L 1987 *Biología de la Reproducción Bovina* Introducción al proceso de examen de la fertilidad de la hembra y el macho La Habana Cuba Editorial Científico Técnica 344 p
- Hopper H W Silcox R W Byerley D J Kiser T E 1993 Follicular development in prepubertal heifers *Animal Reproduction Science* 31 7 12
- Imai K Kobayashy S Tsujino T Shin noh M Goto G Kaneyama K Kojima T 2000 Effect of the frequency of ovum pick up intervals on follicle number oocyte recovery and embryo production rates in cattle *Theriogenology* 53 359 361
- Jamnongjit M y Hammes S R 2005 Oocyte maturation the coming of age of a germ cell *Seminars in reproductive medicine* 23 234 241

- Katska L Smorag Z 1984 Number and quality of oocytes in relation to age of cattle Anim Reprod Sci 7 451-460
- Kelly S J 1977 Studies of the developmental potential of 4 and 8 cell stage mouse blastomeres The journal of experimental zoology 200 365 376
- Kezele P Nilsson E Skinner M 2002 Cell cell interactions in primordial follicles assembly and development Frontiers in bioscience A journal and virtual library 7 1990 1996
- Kimball F A y Hansel W 1974 Estrogen cytosol binding proteins in bovine endometrium and corpus luteum Biol Reprod 11 566 577
- Kruip T Boni R Wurt Y Roelfsen M and Pieterse M 1994 Potencial use of Ovum Pick up for embryo production and breeding in cattle Teriogenology 42 675-684
- Leroy J L M R 2004 Metabolic Changes in follicular fluid of the dominant follicle in high yielding dairy cows early post partum Theriogenology 62 131 1143
- Looney C R Lindsey B R Gonseth C L Johnson D L 1994 Commercial aspects of oocytes retrieval and in vitro fertilization (IVF) for embryo production in problem cows Theriogenology 41 67 72
- Lopez L R Alvarez Neysy Nuñez Ismary Montes Ineyda Solano R Fuentes D Pedroso R Palma G A Brem G 1996 Effect of body condition on the developmental competence of IVM/IVF bovine oocytes Theriogenology 45 292 (abstract)

- Lucy M C Savio J D Badinga L De la Sota R L Thatcher W W 1992 Factors that affect ovarian follicular dynamics in cattle *Journal of Animal Science* 70 3615 3626
- Lussier J G Matton P Guilbault L A Grasso F Mapletoft R J Carruthers T D 1994 Ovarian follicular development and endocrine responses in follicular fluid treated and hemi ovariectomized heifers *J Reprod Fert* 102 95 105
- Machatkova M Krausova K Jokesova E Tomanek M 2004 Developmental competence of bovine oocytes effects of follicle size and the phase of follicular wave on in vitro embryo production *Theriogenology* 61(2 3) 329 335
- Maillard S H Quinton J Lauffenburger N Cordonnier Lefort C Richard J Marchal P Mormede and JP Renard 2003 Consequences of transvaginal follicular puncture on well being in cows 125 555 563
- Manova K Huang EJ Angeles M DeLeon V Sanchez S Pronovost SM 1993 The expression pattern of the c kit ligand in gonads of mice supports a role of the c kit receptro in oocyte growth and in proliferation of spermatogonia *Development Biology* 157 85 89
- Manual Merck De Veterinaria 2001 Editor Susan E Aiello Editor associado Asa Mays [tradução Paulo Marcos Agria de Oliveira] 8 ed São Paulo Roca
- Mapletoft K R J M F Martínez M G Colazo Kastelic J P 2003 The use of controlled internal drug realease device for the regulation of bovine reproduction *J Anim Sci* 81 28 36

- Marín P C Rodríguez A Dorado M J Hidalgo P M Corral P S Sanz P J 2002  
Utilidad del perfil de progesterona plasmática y ecografía en el diagnóstico  
de quistes ováricos en vacas repetidoras de celos Rev Col Cienc Pec  
15(1) 51 62
- Marquant Le G B Gerard B Solari A Thibault C 1989 In vitro culture of bovine  
eggs fertilized either in vivo or in vitro Reprod Nutr Dev 29 559 568
- Martin T L Fogwell R L Ireland J J 1991 Concentrations of inhibins and  
steroids in follicular fluid during development of dominant follicles in  
heifers Biol Reprod 44 693 700
- Martinez M F Colazo M G Kastelic J P Mapletoft R J 2003 Effect of estradiol  
and progesterone on plasma steroid and gonadotropin concentrations in  
CIDR treated Theriogenology 59 224
- Masui Y 1991 The role of cytotrophic factor (CSF) in the control of oocyte cell  
cycle a summary of 20 years study Development Growth and  
Differentiation 33 543 551
- McDougall S C R Burke K L Macmillan N B Williamson 1995 Patterns of  
follicular development during periods of anovulation in pasture fed dairy  
cows after calving Res Vet Sci 58 212 216
- McGee E Hsueh A 2000 Initial and cyclic recruitment of ovarian follicles  
Endocrine reviews 21 200 214
- Meintjes M Bellow M S Paul J B Broussard J R Li L Y Paccamonti D Elts  
B E Godke R A 1995 Transvaginal ultrasound guided oocyte retrieval

- from cyclic and pregnant horse and pony mares for in vitro fertilisation  
 Biol Reprod Mono 1 281 292
- Merton J S De Roos A P W Mullaart E De Ruigh L Kaal L 2003 Factors  
 affecting oocyte quality and quantity in comercial application of embryo  
 tecnologies in the cattle breeding industry Theriogenology 59 651 674
- Monget P y Monniaux D 1995 Growth factors and the control of  
 folliculogenesis Journal of Reproduction and Fertility 49 321 333
- Murakami M Pérez O Fergunson E Behboodi E Denniston R S Godke R A  
 2003 Use of in vivo recovered oocytes and adult somatic cells from the  
 same donor for nuclear transfer in cattle Vet Rec 153 713 714
- Murphy B D Pescador N 1996 Biología celular de la Foliculogénesis bovina II  
 Simposio Internacional de Reproducción Animal Resúmenes Córdoba  
 Argentina 31 octubre 2 noviembre pp 1 11
- Murphy M G W J Enright M A Crowe K McConnell L J Spicer M P  
 Boland J F Roche 1991 Effect of dietary intake on pattern of growth of  
 dominant follicles during the oestrous cycle in beef heifers J Reprod  
 Fertil 92 333 338
- Nava H y Hernández H 2005 Aspiración folicular transvaginal (en línea)  
 Maracaibo V Universidad de Zulia Facultad de Ciencias Veterinarias  
 Consultado 3 mar 2008 Disponible en  
[http://www.avpa.ula.ve/docuPDFs/libros\\_online/manualganadera/seccion  
 8/articulo3\\_s8.pdf](http://www.avpa.ula.ve/docuPDFs/libros_online/manualganadera/seccion8/articulo3_s8.pdf)

- Nibart M Marquant Le G B 1995 Production d'embryons et de veaux par OPU FIV chez les bovins Elevage et Insemination 266 1 23
- Nibart M Silva Pleixer M Thuard J M Durand M Guyader Joly C Ponchon S Marquant Le G B Humblot P 1995 Production d'embryons chez les bovins par fécondation et culture in vitro d'ovocytes collectes sous échographie Renc Rech Ruminants 2 399-402
- Noakes D E Parkinson T J England C W 2001 Arthur's Veterinary Reproduction and Obstetrics Editorial Elsevier 8 ed 868 p
- Ospina J y Aldama H 1995 Enciclopedia Agropecuaria Produccion Pecuaria Ed Terranova editores Bogota Colombia p p 74 78
- Palma G A 2001 Biotecnologia de la Reproduccion Balcarce Argentina Instituto Nacional de Tecnologia Agropecuaria 701 p
- Palma G A 2008 Biotecnologia de la Reproducción 2a Ed Córdoba Argentina Mar del Plata 669 p
- Pangas S A Choy Y Ballow D J Zhao Y Westphal H Matzuk M M y Rajkovic A 2006 Oogenesis required germ cells specific transcriptional regulators Sohlh and Lhx8 National Academy of Sciences of the United States of America 103 8090 8095
- Paul J B Looney C R Lindsey B R Godke R A 1995 Gonadotrophin stimulation of cattle donors at oestrus of transvaginal oocyte collection Theriogenology 43 294 297



- Pedroso R Roller F 1999 Manual de procedimiento para la ISE y resincronizacion para mejorar la fertilidad de las hembras bovinas La Habana CIMA p 1-45
- Perea F G 2005 Manual de Ganadería Doble Propósito Ecografía Reproductiva Trujillo Venezuela pp 602 606
- Peters K E Bergfeld E G Cupp A S Kojima F N Mariscal V Sanchez T Wehrman M E Grotjan H E Hamernik D L Kittok R Kinder J E 1994 Luteinizing hormone has a role in development of fully functional corpora lutea (CL) but is not required to maintain CL function in heifers Biology of Reproduction 51 1248 1254
- Petyim S Bage R Larsson B Hallap T Bergqvist A S Gustafsson H Rodriguez M H 2001 Effect of repeated follicular puncture on ovarian morphology and endocrine parameters in dairy heifers J Vet Med 48 49 63
- Petyim S Bage R Hallap T Bergqvist A S Rodriguez Martinez H Larsson B 2003 Two different schemes of twice weekly ovum pick up in dairy heifers effect on oocyte recovery and ovarian function Theriogenology 60 175–188
- Picton H M Harris S E Muruvi W Chambers E L 2008 The in vitro growth and maturation of follicles Reproduction England 136 703 715
- Pierre M Martinez B Méndez M J 1997 Uso de la ecografia en la reproducción del ganado vacuno Frisona Espanola Temario del Criador Ene Feb pp 114 118

- Pierson R A y Ginther O J 1986 Ovarian follicular populations during early pregnancy in heifers Theriogenology 26(5) 649 659
- Pierson R A Bo G A Adams G P 1993 Uso de la ultrasonografia para el estudio de los eventos reproductivos en el bovino Simposio Internacional de Reproducción Animal Resúmenes 22 24 oct Cordoba Argentina p 10
- Pieterse M C Kappen K A Kruip Th A M Taverne M A M 1988 Aspiration of bovine oocytes during trans vaginal ultrasound scanning of the ovaries Theriogenology 30 751 762
- Pieterse M C 1989 Ultrasonic characteristics of physiological structures on bovine ovaries en M A M Taverne y A H Willemse Diagnostic Ultrasound and Animal Reproduction Kluwer Academic Publishers The Netherlands pp 37 51
- Pieterse M C Vos P L A M Kruip Th A M Wurth Y A van Beneden Th H Willemse A H Taverne M A M 1991 Transvaginal Ultrasound guided follicular aspiration of bovine oocytes Theriogenology 35 19 24
- Pieterse M C Vos P L A M Kruip Th A M Wurth Y A Van Beneden Th H Willemse A H Taverne M A M 1992 Repeated transvaginal ultrasound guided ovum pick up in ECGtreated cows Theriogenology 37 273(abtract)
- Price C A R Webb 1989 Ovarian response to hCG treatment during the oestrous cycle in heifers J Reprod Fertil 86 303 308

- Quintela L A Dias C Garcia P Pena A Becerra J J 2006 Ecografia y reproducción en la vaca Santiago de Compostela Espana Universidad de Santiago de Compostela 92 p
- Rajah R Glaser EM Hirshfield AN 1972 The changing architecture of the neonatal rat ovary during histogenesis Development Dynamics 194 177 192
- Rajamahendran R Ambrose D Burton B 1994 Clinical and research applications of real time ultrasonography in bovine reproduction a review Can Vet 35 563 572
- Ramos A A A M Ferreira W F Sa L S A Camargo J H M Viana M R J M Henry 2006 Protocolos de produção in vitro de embriões na raça Gir Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinaria e Zootecnia 58(3) 341 347
- Rath D 1993 Current status of ultrasound guided retrieval of bovine oocytes Embryo Transfer News 11 10 15
- Reinders J M C Van Wagendonck-deLeeuw A M 1996 Improvement of a MOET program by addition of in vitro production of embryos after ovum pick up from pregnant donor heifers Theriogenology 45 354(abstract)
- Roa N y Castillo E 2006 Ultrasonografía Uso en la reproducción del bovino doble proposito (en linea) Aragua Venezuela Consultado 3 Dic 2008 Disponible en [http://sian.inia.gob.ve/repositorio/revistas\\_tec/inia\\_divulga/numero%208/08roa\\_n.pdf](http://sian.inia.gob.ve/repositorio/revistas_tec/inia_divulga/numero%208/08roa_n.pdf)

- Rodriguez P Limback D McGinnis L K Plancha C E Albertini D F 2008  
Oogenesis Prospects and challenges for the future Journal of Cellular Physiology
- Roller F 2006 Inducción sincronizacion y resincronizacion del celo en hembras bovinas mestizas Holstein x Cebu para optimizar los programas de inseminacion artificial Tesis en opción al grado de Doctor en Ciencias Veterinarias La Habana Cuba CIMA 105 p
- Roschlau K Kuwer A Roschlau D Kuhnt C Johanning S Poppe P Michaelis U Dexne U 2003 OPU and IVP imcrease the efficiency of embryo transfer programes in the bovine five years practical experiences Association Europeenne de Transfert Embryonnaire A E T E Newsleter 18 2 3
- Ruperez R 1997 Diagnóstico del sexo fetal por ecografia en la vaca Albeitar 9 17 18
- Sasamoto Y Sakaguchi M Katagiri S Yamada Y Takashashi Y 2003 The effects of Twisting and type of aspiration needle on the efficiency of transvaginal ultrasound guided ovum Pick up in cattle J Vet Med Sci 65 1083 1086
- Sathananthan A H Selvaraj K Girijashankar M L Ganesh V Selvaraj P Trounson A O 2006 From oogonia to mature oocytes inactivation of the maternal centrosome in humans Microscopy research and technique 69 396-407
- Sauvé R 1998 Ultrasound guided follicular aspiration and in vitro fertilization Arquivos da Faculdade de Veterinária UFRGS 26(1) 141 155

- Savio J D Keenan L Boland M P Roche J F 1988 Pattern of growth of dominant follicles during the estrous cycle of heifers Journal of Reproduction and Fertility 83 663 671
- Savio J D Boland M P Roche J F 1990 Developmental of dominant follicles and length of ovarian cycles in postpartum dairy cows J Reprod Fert 88 581 591
- Savio J D Thatcher W W Badinga L de la Sota R L Wolfenson D 1993 Regulation of dominant follicle turnover during the oestrous cycle in cows Journal of Reproduction and Fertility 97 197 203
- Schellander K E A 1989 In vitro fertilisation of bovine follicular oocytes recovered by laparoscopy Theriogenology 31 927 33
- Scott C A Robertson L de Moura R T D Paterson C Boyd J S 1994 Technical aspects of transvaginal ultrasound guided follicular aspiration in cows Vet Rec 134 440-443
- Seneda M M Esper C R Garcia J M Vantini R Oliveira J A 2001 Relationship between follicle size and ultrasound guided transvaginal oocyte recovery Animal Reproduction Science 67 37-43
- Seneda M M Esper C R Garcia J M Andrade E R 2002 Aspectos técnicos e biológicos da obtenção oócitos bovinos Revisão de literatura Semina Ciências Agrárias Londrina 23(1) 101 110
- Seneda M M da Silva F K Max C M Gomes G E Lisboa L A J Pontes 2008 Folliculogênese en Bovinos (en línea) Londrina Parana Brasil

Consultado 2 de nov 2010 Disponible en  
[http://invitrobrasil.com/pdf/pesquisa/15\\_Seneda\\_MM\\_et\\_al\\_2.pdf](http://invitrobrasil.com/pdf/pesquisa/15_Seneda_MM_et_al_2.pdf)

Seneda M M da Silva F K Max M C Gomes G R Lisboa A L Pontes J H 2009  
 Aspiracion de ovocitos por ultrasonografia transvaginal y produccion de  
 embriones (en linea) Londrina Parana Brasil Consultado 12 de dic  
 2010 Disponible en [http://www.invitrobrasil.com.br/pdf/pesquisa/14\\_Seneda\\_MM\\_et\\_al\\_1.pdf](http://www.invitrobrasil.com.br/pdf/pesquisa/14_Seneda_MM_et_al_1.pdf)

Silvia W J 1999 The role of uterine and ovarianhormone in luteolysis a  
 comparison among species Reprod Domest Anim 34 317 378

Simon L Bungartz L Rath D Niemann H 1993 Repeated bovine oocyte  
 collection by means of a permanently rinsed ultrasound guided aspiration  
 unit Theriogenology 39 312

Sinowatz F Kolle S Petersen E 2001 Biosynthesis and expression of zona  
 pellucida glycoproteins in mammals Cells tissues organs 168 24 35

Sirois J J E Fortune 1988 Ovarian follicular dynamics during the estrous cycle  
 in heifers monitored by real time ultrasonography Biol Reprod 39 308  
 317

Sirois J J E Fortune 1990 Lengthening the bovine estrous cycle with low levels  
 of exogenous progesterone a model for studying ovarian follicular  
 dominance Endocrinology 127 916 925

Solis C A 2006 Estudio de la dinamica folicular mediante ultrasonografia en  
 novillas Simental por Brahman F1 Tesis Licenciatura Chiriqui Panama  
 Universidad de Panamá 156 p

- Sorensen A 1982 Reproduccion Animal Principios y Practicas Trad R E Mata McGraw Hill 539 p
- Sorensen R Cyert M Pedersen R 1985 Activa maturation promoting factor is present in mature mouse oocytes Journal of Cell Biology 100 1637 1640
- Stock A E J E Fortune 1993 Ovarian follicular dominance in cattle relationship between prolonged growth of the ovulatory follicle and endocrine parameters Endocrinology 132 1108 1114
- Stubbins R B Walton J S 1995 Effect of ultrasonically guided follicle aspiration on estrous cycle and follicular dynamic in Holstein cows Theriogenology 43 713 721
- Sunderland S J Crowe M A Boland M B Roche J F Ireland J J 1994 Selection dominance and atresia of follicles during the oestrous cycle of heifers Journal Reproduction and Fertility 101 547 555
- Suzumori N Yan C Matzuk M M Rajkovic A 2002 Nobox is a homeobox encoding gene preferentially expressed in primordial and growing oocytes Mechanisms of development 111 137 141
- Tamayo T M 2000 La ecografia como medio diagnóstico y evaluación de los procesos reproductivos en el bovino (en linea) La Habana Cuba Consultado 16 nov 2010 Disponible en [http://www.produccionanimal.com.ar/informacion\\_tecnica/ecografia\\_ultrasonido/36\\_ecografia\\_reproduccion.pdf](http://www.produccionanimal.com.ar/informacion_tecnica/ecografia_ultrasonido/36_ecografia_reproduccion.pdf)

- Taneja M 2000 Developmental competence of juvenile calf oocytes in vitro and in vivo influence of donor animal variation and repeated gonadotropin stimulation Biol Reprod 62 206-213
- Taylor C R Rajamahendran 1991 Follicular dynamics corpus luteum growth and regression in lactating dairy cattle Can J Anim Sci 71 61-68
- Thanghe S Van Soom A Nauwynck H Coryn M Kruif A 2002 Minireview Functions of the cumulus oophorus during oocyte maturation ovulation and fertilization Molecular Reproduction and Development 61 414-424
- Thatcher WW KL Macmillan PJ Hansen M Drost 1989 Concepts for regulation of corpus luteum function by the conceptus and ovarian follicles to improve fertility Theriogenology 31 149-164
- Thatcher WW MA Driancourt M Terqui L Badinga 1991 Dynamics of ovarian follicular development in cattle following hysterectomy and during early pregnancy Dom Anim Endocrinol 8 223-234
- Totzauer I Kolle S Sinowatz F Plendl J Amselgruber W Petersen E 1998 Localization of the zona glycoprotein ZPB (ZP3 Alpha) and ZPC (ZP3 Beta) in the bovine ovary during pre and postnatal development Annals of Anatomy 180 37-43
- Tsai SJ y Wiltbank MC 1998 Prostaglandin F2alpha regulates distinct physiological changes in early and mid cycle bovine corpora lutea Biol Reprod 58(2) 346-352



- Turzillo A M y Fortune J E 1990 Suppression of the secondary FSH surge with bovine follicular fluid is associated with delayed ovarian follicular development in heifers Journal of Reproduction and Fertility 89 643 653
- Van Der Schans A Van Der Westerlaken L A Eyestone W H Boer M A 1991 ultrasound guided transvaginal collection of oocytes in the cow Theriogenology 35 288(abstract)
- Van Soom A Thange S De Pauw I Maes D de Kruif A 2002 Function of the cumulus oophorus before and during mammalian fertilization Reproduction en domestic animals 37 144 151
- Van Wagtendonk-de Leeuw A M Aerts B J G Den Daas J H G 1998 Abnormal offspring following in vitro production of bovine pre implantation embryos a field study Theriogenology 49 883 894
- Velasquez D J y Mendieta M E 2005 Factores que regulan el desarrollo folicular II (en linea) UAM Iztapalapa DF Mexico Consultado 12 nov 2010 Disponible en [http //www.encuentros uma es/encuentros98/folicular.htm](http://www.encuentros.uma.es/encuentros98/folicular.htm)
- Viana J H M Ferreira A M Sá W F Junior A P 2001 Nascimento de bezerra gerada com auxilio das técnicas de punção folicular e fertilização in vitro no Estado de Centro Nacional de Pesquisa em Gado de Leite Minas Gerais Brasil
- Viana J H M Camargo L S A Ferreira A M Sá W F Fernandes C A C Araujo M C C Ramos A A Marques Jr A P 2002 Ovarian pre stimulation with

- FSH active immunization against inhibin and follicular aspiration results in Gir cattle (*Bos indicus*) *Theriogenology* 57 630
- Viana J H M Ferreira A M Camargo L S A Sa W F Fernandes C A C Marques Junior A P 2003 Efeito da pre estimulação ovariana sobre características de oócitos após punção folicular em bovinos *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia* 55(1) 68 74
- Viana J H M Nascimento A A Pinheiro N L Ferreira A M Camargo L S A Sa W F Marques Jr A P 2003b Caracterização de sequelas subsequentes à punção folicular em bovinos *Pesquisa Vet Bras* 23(3) 119 124
- Viana J H M Camargo L S A Ferreira A M Sa S G Fernandez C C Marquez A P 2004 Short intervals between ultrasonographically guided follicle aspiration improve oocyte quality but do not prevent establishment of dominant follicles in the Gir breed (*Bos indicus*) of cattle *Animal Reproduction Science* 84(1 2) 1 12
- Vos P L A M de Loss F A M Pieterse M C Bevers M M Taverne M A M Dieleman S J 1994 Evaluation of transvaginal ultrasound guided follicle puncture to collect oocytes and follicular fluids at consecutive times relative to the preovulatory LH surge in eCG/PG treated cows *Theriogenology* 41 29 840
- Ward F A Lonergan P Enright B P Boland M P 2000 Factors affecting recovery and quality of oocyte for bovine embryo production in vitro using ovum pick up technology *Theriogenology* 54 33-46

- Wassarman P M Letourneau G 1976 RNA synthesis in fully grown mouse oocytes *Nature* 361 73 74
- Wassarman P M Albertini D F 1994 The mammalian ovum In KNOBIL E NEIL J D (Ed) *The Physiology of reproduction* New York Raven Press pp 79 – 122
- Watson E D Bae S E Thomassen R Thomson S R Woad K Armstrong D G 2004 Insulin like growth factors 1 and –2 and Insulin like growth factor binding protein 2 indominant equine follicles during spring transition and the ovulatory season *Reproduction* 128(3) 321 9
- Wiltbank M C Diskin M G Niswender G D 1991 Differential actions of second messenger systems in the corpus luteum *Journal of reproduction and fertility* 43 65 75
- Xu Z Z Garverick H A Smith G W Smith M F Hamilton S A Youngquist R S 1995 Expression of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone receptor messenger ribonucleic acids in bovine follicles during the first follicular wave *Biology of Reproduction* 53 951 957
- Yang X Y Zhao J G Li H W Li H Liu H F Huang S Z Zeng Y T Huang S Z 2005 Holstein Chinese yellow hybrid recipient oocytes recovered by ovum pickup can improve the development of cloned bovine embryos 2005 *Reproduction Fertility and Development* 2002 2001 2006
- Zeitoun M M Rodriguez H F Randel R D 1996 Effect of season on ovarian follicular dynamics in Brahman cows *Theriogenology* 45 1577 1581